

На правах рукописи

ПУШКАРЁВ
СЕРГЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

**РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И АПОПТОЗА В
ФОРМИРОВАНИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА У ЛИЦ,
ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ
ВОЗДЕЙСТВИЮ**

03.00.01 – Радиобиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на базе кафедры радиационной биологии Челябинского государственного университета и ФГУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины», г. Челябинск

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Аклеев Александр Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Пелевина Ирина Ивановна

доктор химических наук, профессор
Серебряный Александр Маркович

Ведущая организация: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 г. в «___» часов
на заседании диссертационного совета Д.501.001.65. в Московском
государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119991,
г.Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, ауд.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале библиотеки
биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,



Т.В. Веселова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время проблема влияния хронического воздействия низкоинтенсивного излучения, особенно в диапазоне малых доз, на организм человека является особенно актуальной (Кудряшов, 2004). Открытие таких эффектов малых доз (ЭМД) как адаптивный ответ (АО) и повышение радиочувствительности (ПР) после облучения в малых дозах, эффекта свидетеля и нестабильности генома заставляет пересмотреть, патофизиологические механизмы формирования отдалённых эффектов низкоинтенсивного радиационного воздействия в малых дозах (Mothersill, Seymour, 2000; Пелевина и др., 2003). Наименее изучены патофизиологические механизмы, обуславливающие формирование таких отдалённых последствий радиационного воздействия, как нарушение гомеостаза и иммунитета, а так же канцерогенез (Сусков, Кузьмина, 2001; Krestinina et al., 2005; Little, 2006; Аклеев и др., 2008).

Предполагается, что наряду с непосредственным повреждением ДНК в результате воздействия излучения на клетку, в реализации последствий облучения и формировании отдалённых эффектов особое значение имеет состояние клеточных защитных механизмов: систем антиоксидантной защиты, репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза (Пелевина и др., 2000; Бондарчук, 2003; Серебряный и др., 2004).

Всё вышесказанное обуславливает актуальность изучения проблемы влияния хронического облучения в диапазоне низких и промежуточных доз на состояние защитных систем клетки, а так же роли репарации повреждений ДНК и апоптоза в формировании реакций АО и ПР.

Цель работы

Исследовать роль процессов репарации однонитевых и двунитевых разрывов ДНК, а так же апоптоза в формировании адаптивного ответа лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому

облучению, в отдалённый период после облучения.

Основные задачи исследования:

1. Оценить исходный уровень фрагментации ДНК лимфоцитов и частоту апоптоза, а так же уровни данных показателей на различных этапах инкубации клеток и в различные сроки после облучения в дозе 1 Гр при наличии предварительного воздействия в дозе 0,05 Гр и в его отсутствие.
2. Изучить зависимость исходного уровня фрагментации ДНК и частоты апоптоза, а так же степени фрагментации ДНК и уровней апоптоза на различных этапах инкубации клеток и в различные сроки после облучения в дозе 1 Гр от величины доз хронического облучения костного мозга и мягких тканей, а так же от мощности дозы облучения костного мозга.
3. Оценить частоту случаев адаптивного ответа в различные сроки после облучения в дозе 1 Гр у лиц, подвергшихся хроническому облучению (диапазон доз на костный мозг от 0,21 Гр до 1,42 Гр) в отдалённом периоде, через 57-58 лет после начала хронического радиационного воздействия.
4. Проанализировать взаимосвязь эффективности репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК, а так же уровня апоптоза со способностью к индукции адаптивного ответа у лиц, подвергшихся хроническому облучению.

Научная новизна

Впервые оценена эффективность репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови у людей, подвергшихся хроническому облучению в результате радиационного загрязнения р. Теча, после дополнительного острого облучения клеток *in vitro* в дозе 1 Гр. Показано, что эффективность репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах у людей, после хронического облучения (в диапазоне доз на костный мозг от 0,21 Гр до 1,42 Гр) не отличается от таковой в лимфоцитах людей контрольной группы.

Впервые проводилась оценка влияния облучения в дозе 0,05 Гр, на эффективность процессов репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК, а так же уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у людей, подвергшихся хроническому облучению в результате радиационного загрязнения р. Теча, в различные периоды инкубации клеток *in vitro*, а так же в различные сроки после дополнительного острого облучения клеток *in vitro* в дозе 1 Гр. Показано отсутствие влияния предварительного облучения лимфоцитов *in vitro* в дозе 0,05 Гр на эффективность репарации одно- и двунитевых разрывов после острого облучения клеток *in vitro* в дозе 1 Гр.

Впервые проведена комплексная оценка вклада процессов репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК, а так же апоптотической гибели лимфоцитов в формирование адаптивного ответа у людей, подвергшихся хроническому облучению в результате радиационного загрязнения р. Теча. Показано, что более редкая, по сравнению с контролем, регистрация случаев повышения радиочувствительности, у облучённых людей может быть связана со снижением уровня апоптоза клеток под влиянием хронического облучения.

Положения, выносимые на защиту

1. В отдалённом периоде, через 57-58 лет после начала хронического радиационного воздействия (диапазон доз на костный мозг от 0,21 Гр до 1,42 Гр), у облучённых людей наблюдается снижение исходного уровня апоптоза лимфоцитов, сохраняющееся и в ходе инкубации клеток.
2. В отдалённом периоде отсутствует влияние хронического радиационного воздействия (в диапазоне доз на костный мозг от 0,21 Гр до 1,42 Гр) на эффективность репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови после острого облучения клеток в дозе 1 Гр.
3. Одним из факторов, обуславливающих более редкую регистрацию случаев повышения радиочувствительности у облучённых людей, может являться снижение способности лимфоцитов к гибели по механизму апоптоза.

Практическая значимость

Результаты данного исследования показали снижение способности лимфоцитов периферической крови к формированию радиационно-индуцированного повышения радиочувствительности в отдалённые сроки после хронического облучения.

Исследована роль репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК, а также апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови в формировании адаптивного ответа у лиц, подвергшихся хроническому облучению.

Полученные результаты внесли вклад в обоснование необходимости исследования апоптоза в отдалённые сроки после облучения у лиц, подвергшихся хроническому облучению, для целей формирования группы повышенного канцерогенного риска.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции, посвящённой 50-летию аварии на ПО «Маяк» (Челябинск, 2007), юбилейной конференции биологического факультета ЧелГУ (Челябинск, 2008), научной сессии, посвящённой 10-летию Южно-Уральского научного центра РАМН (Челябинск, 2008).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и выводов. Работа изложена на 194 страницах, иллюстрирована 51 таблицей, и 65 рисунками. Библиографический указатель включает в себя 151 наименование печатных источников, из них 83 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованной группы

Обследовано 50 человек. Из них 27 составили группу лиц, подвергшихся хроническому облучению, 23 – группу сравнения. Группы были сформированы по принципу случайной выборки. Первая группа была представлена людьми, проживающими в окрестностях реки Теча, для которых с использованием дозиметрической системы реки Теча TRDS-2000 (Дёгтева и др., 2000) была восстановлена индивидуальная доза облучения красного костного мозга (ККМ) и мягких тканей. В состав группы сравнения входили лица, проживающие на близлежащих территориях, не подвергшихся радиоактивному загрязнению и имеющие сходные социально-экономические и медицинские условия с группой облучённых лиц.

Сравниваемые группы были сопоставимы по половому (преобладали женщины), национальному (преобладало тюркское население) и возрастному составу. Средний возраст составил $68,1 \pm 1,2$ года для группы облучённых людей и $69,7 \pm 1,7$ года для контрольной группы. Группа облучённых лиц сопоставима с контрольной группой по качественному и количественному составу общесоматической патологии. В исследование включались лица без грубой соматической патологии (злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания и др.), не имеющие острых инфекционных заболеваний и обострений хронических воспалительных заболеваний. Все участники исследования подписали информированное согласие на своё участие в нём.

Исследование проводилось через 57 - 58 лет после начала хронического облучения. Доза на мягкие ткани была обусловлена воздействием излучения с низкой ЛПЭ: внешнего гамма-излучения и внутреннего облучения преимущественно от ^{137}Cs . Доза внешнего облучения ККМ и мягких тканей сформировалась в течение 10 лет после начала облучения. Внутреннее облучение ККМ так же было наиболее интенсивным в первые 10 лет от

начала облучения, главным образом, за счет β - излучения остеотропного ^{90}Sr . Ко времени исследования средние дозы облучения ККМ и мягких тканей в группе облучённых лиц составили $0,74 \pm 0,06$ Гр и $0,05 \pm 0,01$ Гр соответственно. При этом критическим органом является красный костный мозг – центральный орган гемо- и иммунопоэза. Со временем мощность дозы облучения снижалась. К началу исследования средняя мощность дозы облучения ККМ составляла $0,17 \pm 0,02$ мГр/год.

Схема исследования

В качестве объекта исследования были использованы лимфоциты периферической крови, выделенные путём центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин. Сразу после выделения часть лимфоцитов использовали для оценки исходных уровней фрагментации ДНК. Остальные лимфоциты разделяли на 10 проб, стимулировали ФГА и помещали в термостат, где клетки в течение 20 ч. инкубировались при температуре 37°C . По истечении этого времени, пять проб подвергалась воздействию γ – излучения в дозе 0,05 Гр, ещё пять проб такому воздействию не подвергалась. Облучение проб производилось с использованием установки ИГУР-1 (источник γ – излучения - ^{137}Cs , мощность излучения - 0,71 Гр/мин). После этого, как облучённые, так и необлучённые пробы снова помещались в термостат и инкубировались при 37°C в течение ещё 4 ч. Далее оценивались уровни исследуемых показателей через 24 ч. после начала инкубации и уровень через 4 ч. после облучения в дозе 0,05 Гр. Три пробы из числа облучённых в дозе 0,05 Гр и три пробы, не облучавшиеся в данной дозе, подвергали воздействию γ – излучения в дозе 1 Гр (источник - ^{137}Cs , мощность - 0,71 Гр/мин.). Как в случае наличия предварительного облучения, так и при его отсутствии, уровни исследуемых показателей анализировались непосредственно после облучения в дозе 1 Гр, а так же спустя 2 ч. и 24 ч. Оценивался так же уровень после 48 ч. инкубации и уровень спустя 28 ч. после облучения в дозе 0,05 Гр.

Метод ДНК-комет

Для оценки апоптоза и репарации использовался метод ДНК-комет (Ostling, Johanson, 1984; Singh et al., 1988). В основе метода лежит опосредованная воздействием постоянного электрического поля миграция

ДНК единичных клеток в агарозном геле.

Наблюдаемый при этом во флуоресцентном микроскопе геном индивидуальной

клетки представлен в виде электрофоретического следа, так называемой «кометы»

(рис.1). Критериями оценки степени фрагментации ДНК в

клетке являются длина хвоста кометы, доля

мигрировавшей ДНК и интегральный показатель -

момент хвоста (Тронов, Пелевина, 1996). Для оценки

количества двунитевых разрывов (ДР) ДНК в

лимфоцитах периферической крови использовался

нейтральный вариант метода (Oliv et al., 1991).

Использование щелочного варианта метода комет (Singh et al., 1988)

позволило оценить так же количество однонитевых разрывов (ОР) ДНК и щелочнолабильных сайтов. Полученные препараты окрашивали Ethidium Bromide (20 мг/мл) и анализировали в среднем по 50 клеток на пробу.

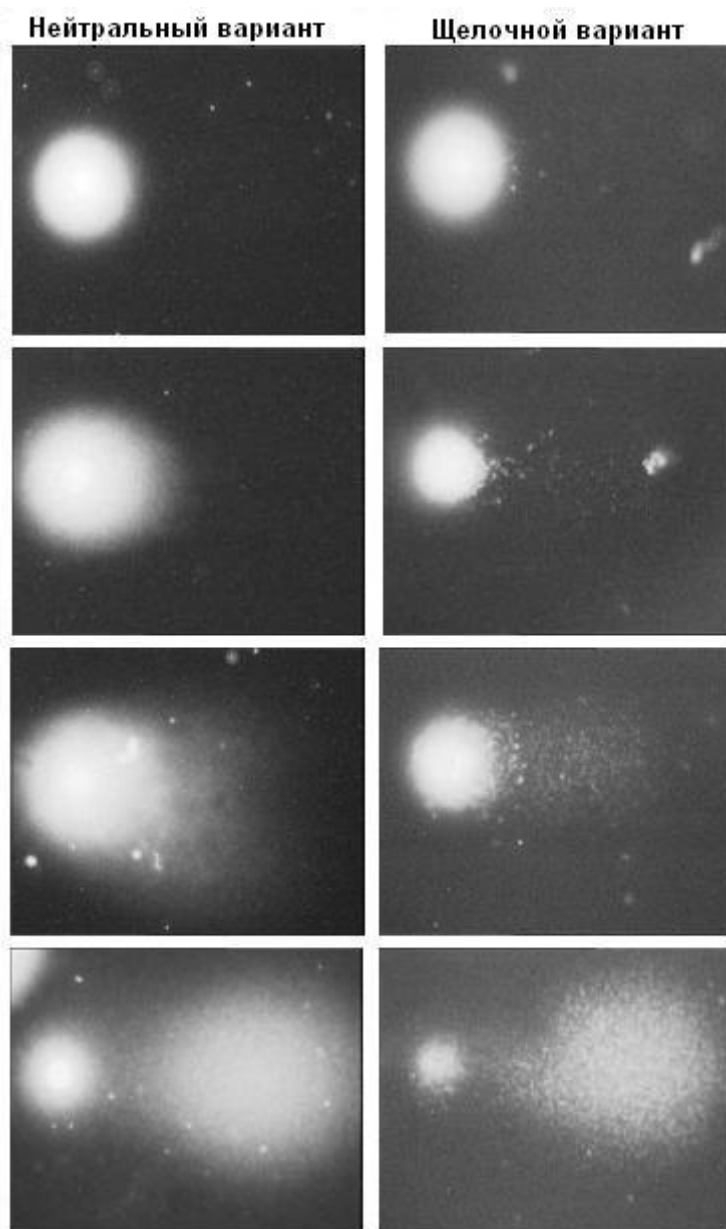


Рис.1. Примеры ДНК-комет, отражающих различные степени фрагментации ДНК

Критерии для анализа эффективности репарации разрывов ДНК, частоты апоптоза лимфоцитов и оценки адаптивного ответа

Для оценки эффективности репарации сопоставлялись между собой средние величины моментов хвоста после 24 ч. инкубации (или через 4 ч. после облучения в дозе 0,05 Гр), уровни непосредственно после облучения в дозе 1 Гр, а так же 2 ч. и 24 ч. спустя.

Апоптотическими считались кометы, доля мигрировавшей ДНК в которых превышала 40 %.

Критерием наличия у человека реакции адаптивного ответа (АО) или повышения радиочувствительности (ПР) служило появление после облучения в дозе 1 Гр достоверного отличия средней величины какого-либо из параметров комет в пробе, предварительно облучённой в дозе 0,05 Гр, от величины того же показателя в пробе, не подвергавшейся предварительному облучению. Реакции анализировались непосредственно после облучения в дозе 1 Гр, а так же 2 ч. и 24 ч. спустя.

Микроядерный тест

Для оценки вклада репарации разрывов ДНК, а так же апоптоза в различные периоды инкубации клеток в формирование адаптивного ответа, результаты, полученные при использовании метода ДНК-комет, сопоставлялись с результатами микроядерного теста.

В ходе исследования образцы крови делили на 3 части, в каждый флакон добавляли ФГА до концентрации в среде 7 мкг/мл. После 24 ч. инкубации при 37°C, одну из проб подвергали γ -облучению в дозе 0,05 Гр. Через 5 часов после этого пробу, подвергшуюся воздействию дозы 0,05 Гр, и одну из не подвергавшихся этому воздействию проб облучали в дозе 1 Гр. Через 48 часов от начала инкубации к пробам добавляли цитохалазин В до концентрации в среде 5-6 мкг/мл. Спустя 24 часа после добавления цитохалазина В клетки выделяли и фиксировали. Подсчитывали количество клеток с микроядрами на 1000 двуядерных клеток.

Наличие у человека АО или ПР определяли сравнивая уровни микроядер после облучения в дозе 1 Гр в пробе, предварительно облучённой в дозе 0,05 Гр, и в пробе, не подвергавшейся предварительному облучению.

Статистические методы

Статистическая обработка материала осуществлялась с использованием программы Statistica 6.0, а так же встроенного пакета статистического анализа MS Excel 2003. Сопоставление величин оцениваемых параметров комет, частот апоптоза и средних уровней микроядер производилось с использованием критерия Уилкоксона-Манна (Лакин, 1990; Юнкеров, Григорьев, 2002). Для выявления корреляций вычислялся стандартный коэффициент корреляции (Лакин, 1990). Определяя наличие у обследованного человека АО или ПР с помощью микроядерного теста, частоты клеток с микроядрами сравнивали при помощи критерия Пирсона (Хи-квадрат) (Лакин, 1990; Юнкеров, Григорьев, 2002). Критерий Хи-квадрат использовался и при сопоставлении групп друг с другом по количеству случаев АО или ПР, а так же при сопоставлении методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптивный ответ у лиц, подвергшихся хроническому облучению

Согласно полученным результатам среднее количество клеток с микроядрами после облучения лимфоцитов в дозе 1 Гр в группе подвергшихся хроническому облучению лиц было повышено, по сравнению с аналогичным показателем в контроле (табл. 1). Отличия от контроля по уровню микроядер отсутствуют при условии предварительного облучения клеток в дозе 0,05 Гр. При этом в группе облучённых людей не выявлено отличий между количествами клеток с микроядрами в пробе, облучённой в дозе 1 Гр, и пробе, подвергшейся такому же воздействию после

Средние количества клеток с микроядрами (на 1000 клеток) при различных вариантах облучения лимфоцитов

Группа	Значение	Исходный уровень	Облучение 1 Гр	Облучение 0,05Гр +1 Гр
Облучённые N=16	среднее	21,94 ± 2,85	164,13 ± 7,44 p*=0,045	165,63 ± 8,01
	σ	11,64	30,38	32,70
	max	48,00	224,00	217,00
	min	7,00	118,00	114,00
	медиана	21,5	161	168,5
Контроль N=10	среднее	15,10 ± 3,06	141,20 ± 5,34 p**=0,041	157,50 ± 9,47
	σ	9,86	17,24	30,56
	max	40,00	168,00	200,00
	min	4,00	114,00	87,00
	медиана	13	139,5	160

p* – достоверность отличия от контрольной группы

p** - достоверность отличия от показателя с адаптирующим облучением

предварительного облучения в дозе 0,05 Гр, тогда как в контроле предварительное облучение приводит к повышению количества клеток с микроядрами (табл. 1). Следовательно повышенная радиочувствительность лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому облучению сочетается с отсутствием у них изменений радиочувствительности клеток под воздействием дозы 0,05 Гр. Можно предполагать, что именно с такой разницей реакции на предварительное облучение и связано наблюдаемое в группе облучённых лиц при использовании микроядерного теста отсутствие случаев ПР (табл. 2).

В то же время, согласно результатам, полученным при использовании обоих вариантов метода ДНК-комет, частоты АО и ПР в группе облучённых лиц не отличаются от контрольных. Отличия от контроля по частотам данных реакций отсутствуют так же и в дозовых подгруппах (диапазоны доз на ККМ: 0,21 Гр - 0,7 Гр и 0,7 Гр – 1,42 Гр). Отличия по частотам реакций отсутствуют и при сравнении подгрупп друг с другом.

Реакции, выявленные с использованием микроядерного теста

Реакция	Контроль N=10		Облучённые N=16	
	абс.	%	абс.	%
АО	1	10,0	0	0,0
НДА	2	20,0	9	56,3
НДПР	3	30,0	7	43,8
ПР	4	40,0	0	0,0 p*=0,006

АО – адаптивный ответ; НДА – статистически недостоверный адаптивный ответ; НДПР – статистически недостоверное повышение радиочувствительности; ПР – повышение радиочувствительности; p* – достоверность отличия от контрольной группы

Апоптоз лимфоцитов у лиц, подвергшихся хроническому облучению

Особенностью обследованной группы лиц, подвергшихся хроническому облучению, является сниженный по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе исходный уровень апоптоза по критерию ДР ДНК. Сниженные уровни данного показателя отмечаются и после 24 ч. инкубации и непосредственно после облучения в дозе 1 Гр (рис. 2). Предположение о наличии угнетающего действия хронического облучения на способность клеток к гибели по механизму апоптоза было высказано рядом авторов, сообщавших об угнетении p53-зависимого апоптоза под влиянием хронического облучения (Takahashi, 2002; Enns, 2004; Миль и др., 2005; Xia et al., 2004).

Ещё одним возможным объяснением сниженного уровня апоптоза, выявленного с использованием метода ДНК-комет, может быть незавершённый характер апоптотической гибели части клеток, когда гибель клетки, начавшаяся как апоптоз, завершается гибелью по пути некроза, из-за истощения энергетических ресурсов (Тронов и др., 1998, 1999).

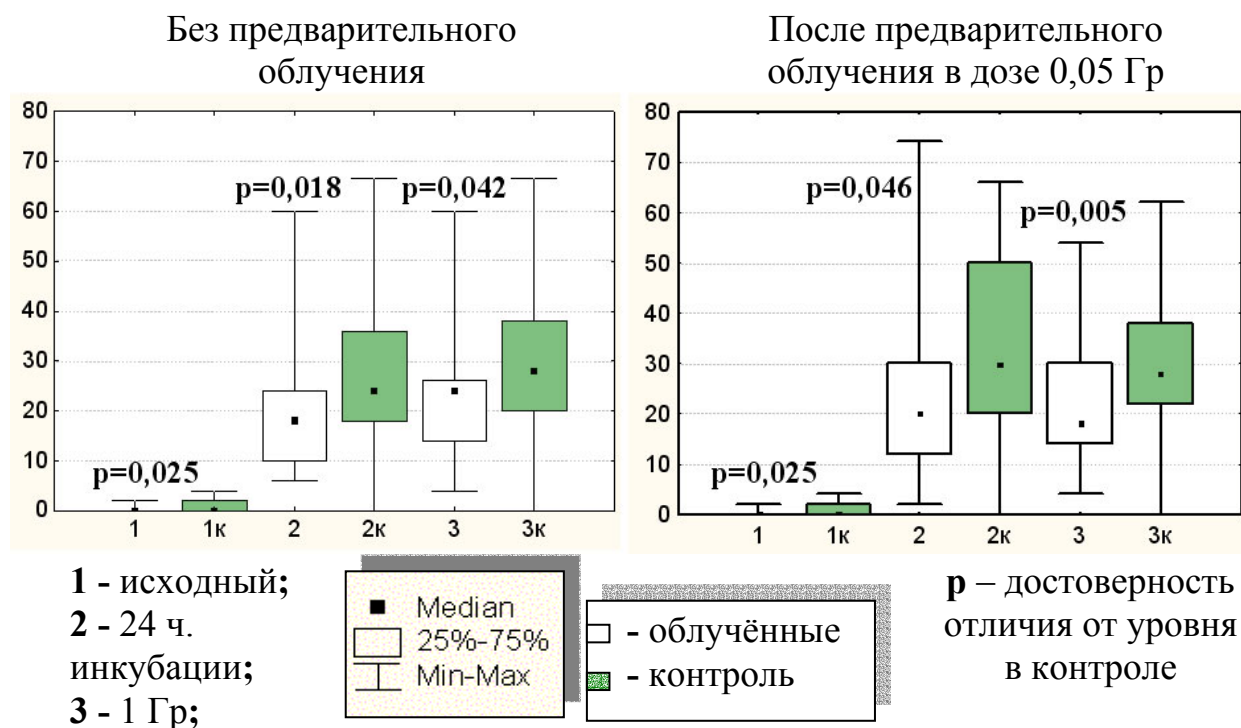


Рис. 2. Уровни апоптоза в группе облучённых лиц и в контроле по критерию ДР ДНК

Отсутствие отличий между группами по частоте апоптоза, при использовании щелочного варианта метода комет может указывать на связь этих отличий с количеством комет, соответствующих терминальным стадиям апоптоза. Поскольку в случае использования щелочного варианта метода такие клетки могут выпадать из анализа.

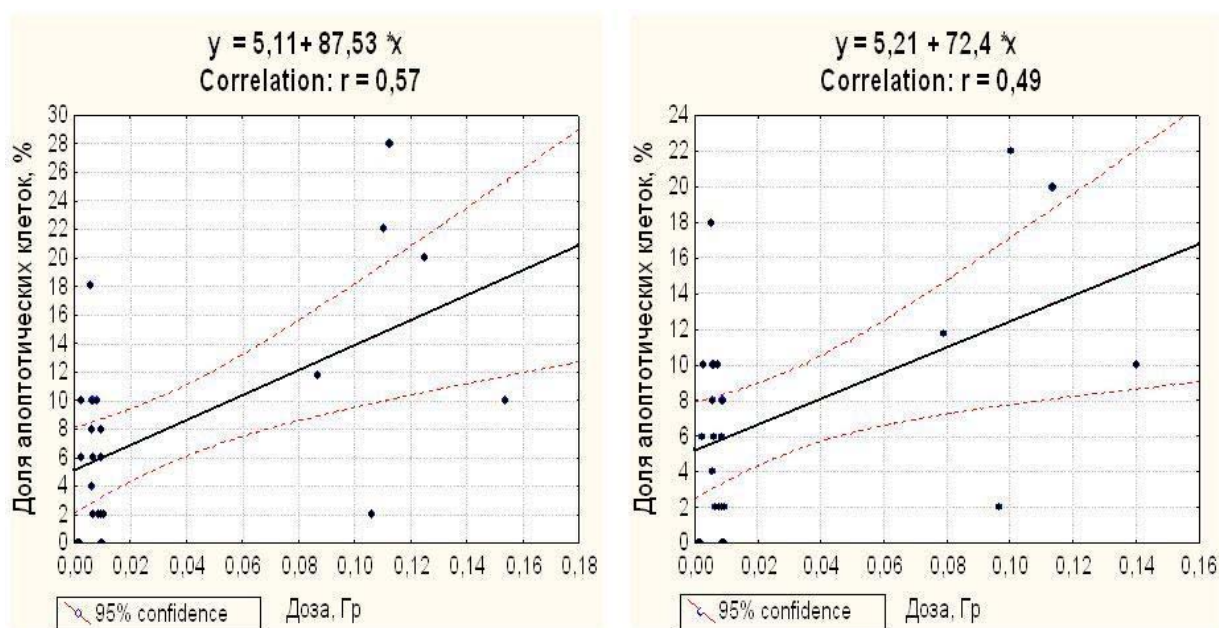
Достоверных отличий уровня апоптоза в клетках, подвергшихся предварительному облучению в дозе 0,05 Гр, от уровня данного показателя в клетках, неподвергавшихся предварительному облучению, не было выявлено ни в группе облучённых лиц ни в контрольной группе.

При использовании щелочного варианта метода, как в группе облучённых лиц, так и в контроле, изменения частоты апоптоза, связанные с влиянием инкубации, выражены слабо, что может быть связано с уже упомянутым выше выпадением из анализа клеток, находящихся в терминальных стадиях апоптоза. Отличия между уровнями апоптоза в пробах, подвергнутых предварительному облучению, и аналогичных им

пробах, не подвергавшихся такому воздействию, отсутствуют, так же как и при оценке апоптоза по количеству ДР.

Не было выявлено зависимостей частоты апоптоза от величин доз облучения ККМ или мягких тканей. При этом было показано понижение частоты апоптоза, выявленной непосредственно после облучения лимфоцитов в дозе 1 Гр, при понижении мощности дозы хронического облучения ККМ (коэффициент корреляции $r = 0,45$).

При использовании щелочного варианта метода в пробах, подвергшихся предварительному облучению в дозе 0,05 Гр, выявлены положительные корреляции количеств ОР и уровней апоптоза лимфоцитов на вторые сутки инкубации, а так же через 2 ч. (рис. 3) и 24 ч. (рис. 4) после облучения клеток в дозе 1 Гр от доз внешнего облучения ККМ и мягких тканей.

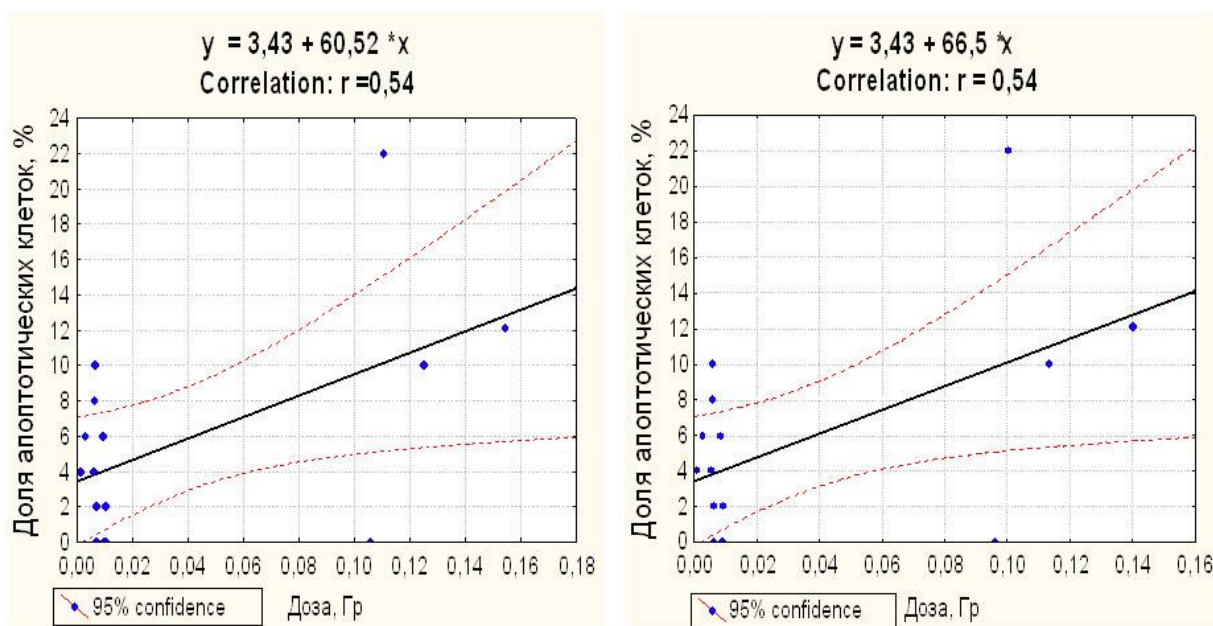


Зависимость от дозы внешнего облучения ККМ

Зависимость от дозы внешнего облучения мягких тканей

Рис. 3. Дозовые зависимости для уровня апоптоза через 2 ч. после облучения клеток в дозе 1 Гр

Эти данные могут свидетельствовать о возможности модифицирующего действия предварительного облучения на уровень апоптоза. Вероятно, выраженность такого действия зависит от дозы хронического облучения ККМ и мягких тканей.



Зависимость от дозы внешнего
облучения ККМ

Зависимость от дозы внешнего
облучения мягких тканей

Рис. 4. Дозовые зависимости для уровня апоптоза через 24 ч. после облучения клеток в дозе 1 Гр

Наблюдаемые закономерности указывают на возможность влияния дозы 0,05 Гр на апоптотическую гибель лимфоцитов после облучения в дозе 1 Гр. Однако отсутствие достоверных отличий между уровнями апоптоза лимфоцитов, облучённых в дозе 0,05 Гр, от соответствующих уровней в неподвергавшихся предварительному воздействию клетках не даёт возможности говорить о таком влиянии, как о механизме формирования адаптивного ответа. Тем не менее, учитывая выявленное в данной работе снижение уровня апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому облучению, нельзя исключить участия апоптотической гибели лимфоцитов в формировании наблюдаемых отличий между группой облучённых лиц и контролем по частоте ПР.

Связь фрагментации ДНК с репарацией и апоптозом.

Эффективность репарации ДР и ОР и её роль в формировании АО

При анализе степени фрагментации ДНК, было показано, что исходное количество ДР, а так же уровни данного показателя после первых суток инкубации у подвергшихся хроническому облучению людей достоверно

снижены по сравнению с аналогичными показателями в контроле, так же как это было отмечено и для частоты апоптоза (рис. 5).

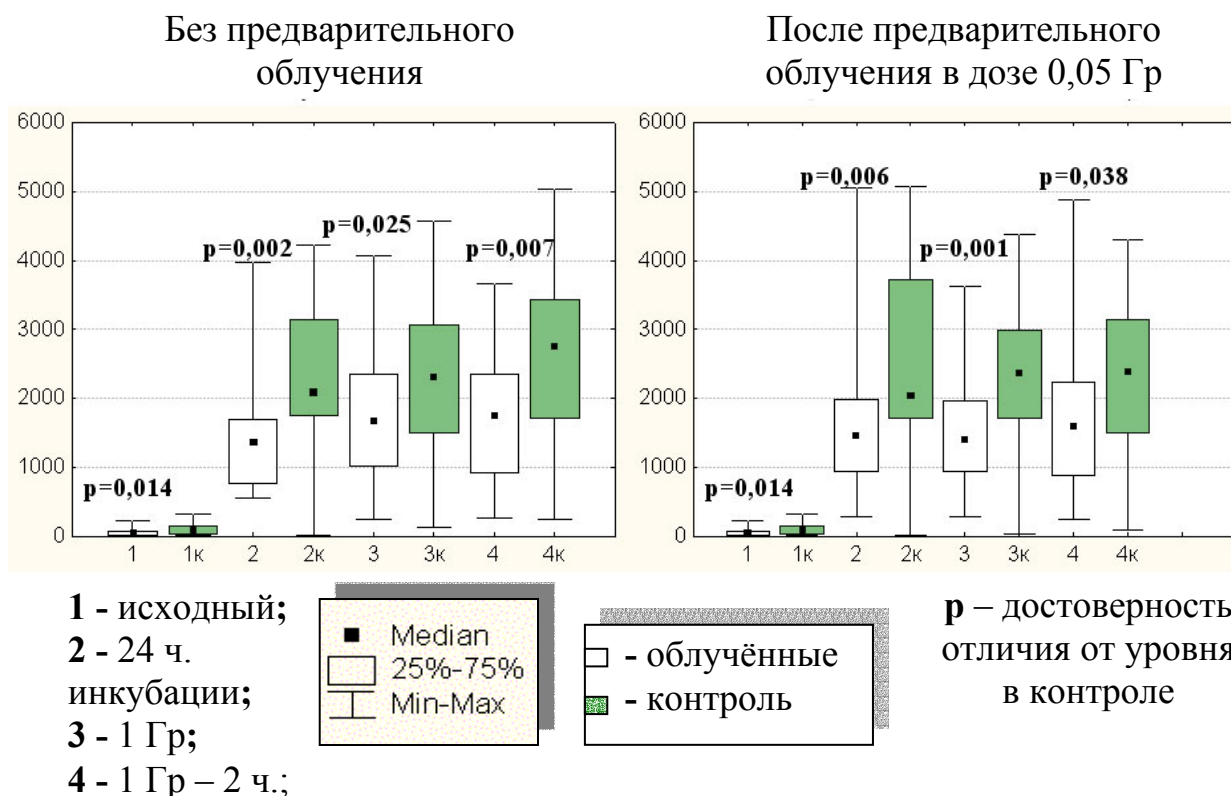


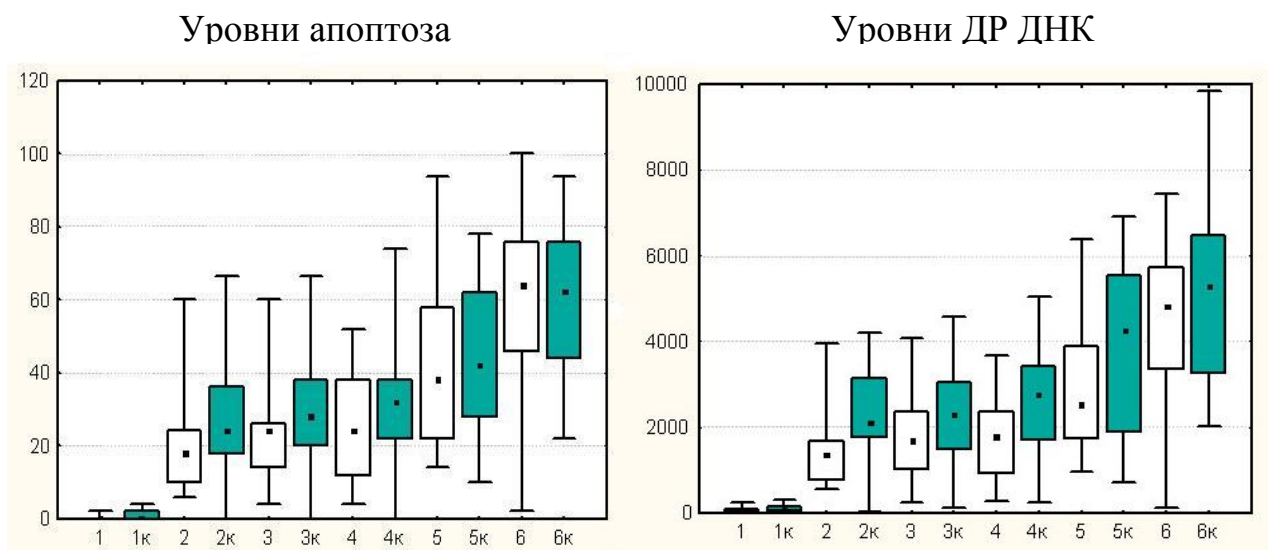
Рис. 5. Уровни ДР ДНК в группе облучённых лиц и в контроле

Исходное количество ОР ДНК, не отличается от исходного уровня в контроле. Независимо от наличия предварительного воздействия на клетки в дозе 0,05 Гр, отличий от контроля по числу ОР не отмечается и в других исследованных точках. Эти результаты так же совпадают с данными, полученными при исследовании апоптоза.

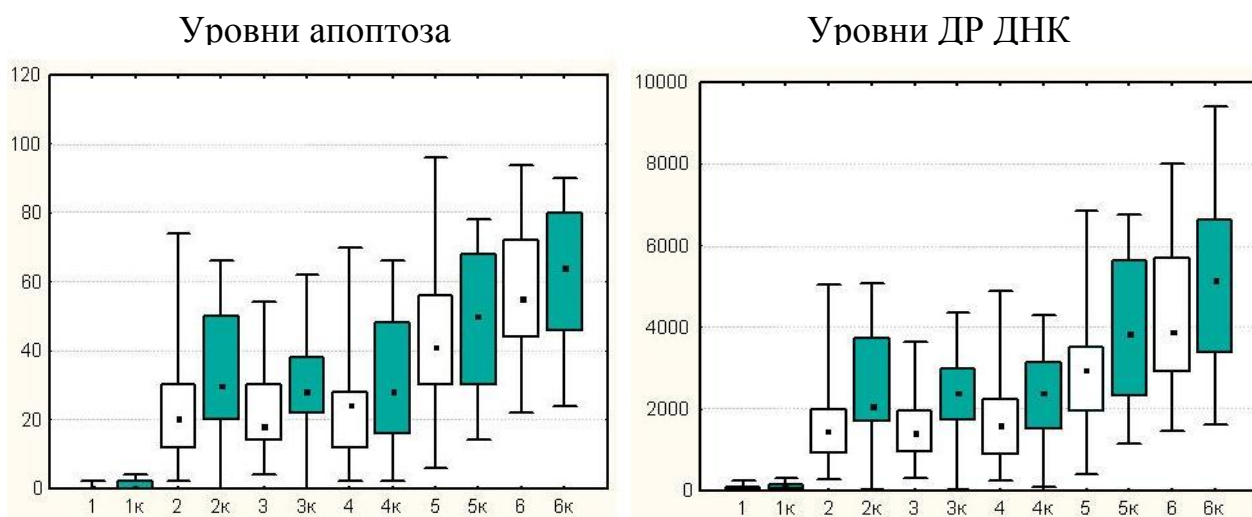
Отмечено, что в обеих группах имеет место увеличение количества ДР в ходе 48 ч. инкубации, наблюдаемое и в отсутствие предварительного облучения лимфоцитов (рис. 6-а), и при наличии такого воздействия (рис. 6-б). Сходство этих изменений с повышением уровня апоптоза указывает на то, что увеличение количества ДР может являться следствием гибели инкубируемых клеток по механизму апоптоза.

Корреляционные связи уровней ДР и ОР с величинами и мощностью доз хронического облучения ККМ и мягких тканей в большинстве случаев совпадают с зависимостями для частот апоптоза. В частности при

А) В отсутствие предварительного облучения клеток



Б) При условии предварительного облучения клеток в дозе 0,05 Гр



1 - исходный; 2 - 24 ч.инкубации; 3 - 1 Гр; 4 -1 Гр – 2 ч.; 5 - 48 ч. инкубации; 6 -1 Гр –24ч.

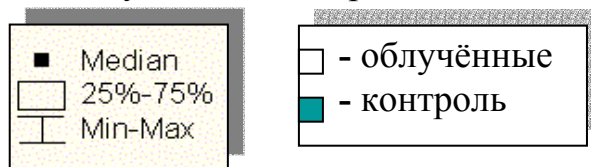
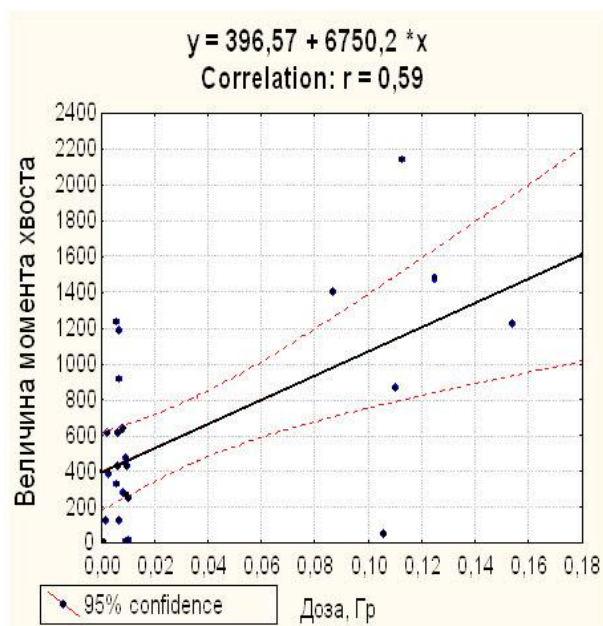
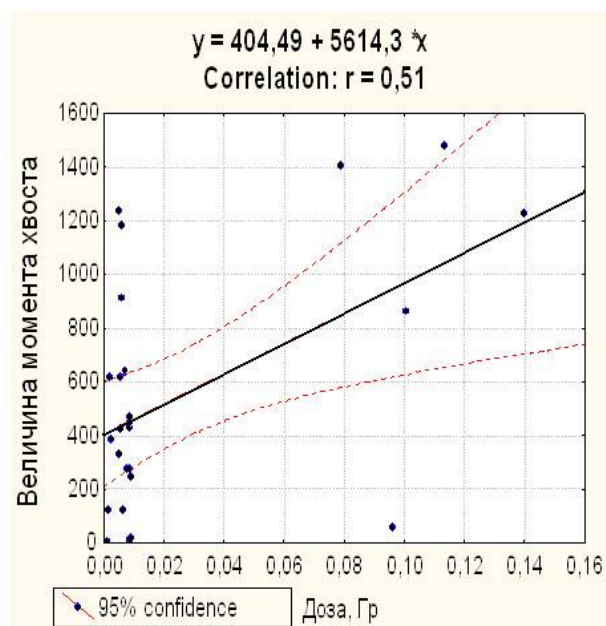


Рис. 6. Изменения уровней апоптоза и ДР ДНК (величины момента хвоста комет) в ходе инкубации лимфоцитов

использовании щелочного варианта метода обнаружены такие же, как и для апоптоза, прямые зависимости от дозы хронического внешнего облучения для степени фрагментации ДНК через 2 ч. после облучения клеток в дозе 1 Гр (рис. 7) и через 24 ч. после облучения (рис. 8).

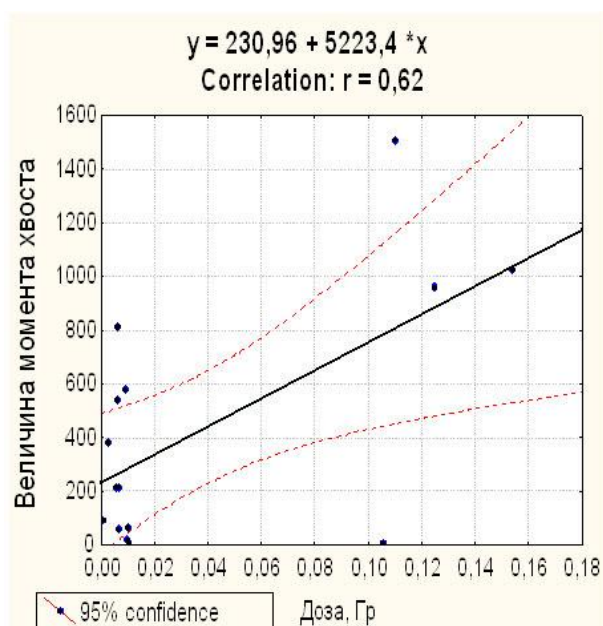


Зависимость от дозы внешнего облучения ККМ

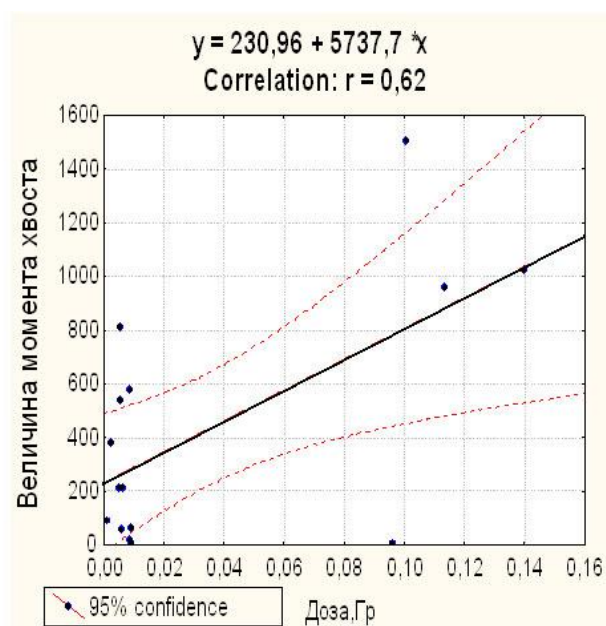


Зависимость от дозы внешнего облучения мягких тканей

Рис. 7. Дозовые зависимости для уровня ОР ДНК через 2 ч. после облучения клеток в дозе 1 Гр



Зависимость от дозы внешнего облучения ККМ



Зависимость от дозы внешнего облучения мягких тканей

Рис. 8. Дозовые зависимости для уровня ОР ДНК через 24 ч. после облучения клеток в дозе 1 Гр

При этом, не было выявлено отличий между группами, а так же отличий обеих дозовых подгрупп друг от друга и от контроля по эффективности процессов репарации ДР и ОР, а так же отличий по чувствительности данных процессов к влиянию предварительного облучения в дозе 0,05 Гр. Поскольку, как показали результаты исследования, величины момента хвоста, выявленные при использовании как нейтрального так и щелочного вариантов метода комет, после 24 ч. инкубации, непосредственно после облучения в дозе 1 Гр и 2 ч. спустя не отличаются друг от друга, как в группе облучённых так и в контрольной группе, независимо от наличия предварительного воздействия на клетки в дозе 0,05 Гр (рис. 5).

Отсутствие зависимости от дозы хронического облучения уровней ДР в различные периоды после воздействия на клетки дозы 1 Гр свидетельствует об отсутствии зависимости эффективности репарации ДР от дозы хронического облучения ККМ и мягких тканей. Сходство дозовых зависимостей, выявленных для уровней ОР, с таковыми для частот апоптоза, выявленного при использовании щелочного варианта метода не позволяет говорить о наличии связи между эффективностью репарации ОР и величиной дозы облучения ККМ или мягких тканей. Таким образом, существенного вклада процессов репарации одно- и двунитевых повреждений ДНК в формирование АО или ПР у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на ККМ в диапазоне доз от 0,21 Гр до 1,42 Гр и мягких тканей (в диапазоне от 0,01 Гр до 0,14 Гр) выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. В отдалённые сроки, через 57-58 лет, после начала хронического воздействия излучения с низкой ЛПЭ в группе облучённых лиц (дозы облучения костного мозга от 0,21 Гр до 1,42 Гр) отмечается повышение среднего уровня микроядер после облучения клеток в дозе 1 Гр по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. В условиях

предварительного воздействия на клетки в дозе 0,05 Гр, уровень микроядер не отличался от контрольного.

2. В отдалённые сроки после начала хронического воздействия излучения с низкой ЛПЭ частота случаев повышения радиочувствительности, выявленных при помощи микроядерного теста после дополнительного облучения в дозах 0,05 Гр и 1 Гр, в группе облучённых лиц снижена по сравнению с контрольной.
3. Через 57-58 лет после начала хронического радиационного воздействия в группе облучённых лиц (дозы облучения костного мозга от 0,21 Гр до 1,42 Гр) уровень апоптоза лимфоцитов крови снижен по сравнению с аналогичным показателем в контроле. Снижение уровня апоптоза отмечается так же после 24 ч. инкубации лимфоцитов и непосредственно после облучения клеток в дозе 1 Гр. Данный эффект не зависел от факта предварительного облучения клеток в дозе 0,05 Гр.
4. Установлена линейная зависимость уровня апоптоза через 2 ч. и 24 ч. после облучения в дозе 1 Гр лимфоцитов, подвергшихся предварительному воздействию в дозе 0,05 Гр, от дозы хронического облучения костного мозга и мягких тканей.
5. В отдалённые сроки после низкоинтенсивного радиационного воздействия эффективность репарации двунитевых и одностранных разрывов ДНК у облучённых людей не отличалась от таковой в контрольной группе. Эффективность репарации одностранных и двунитевых разрывов не зависела от факта предварительного облучения клеток в дозе 0,05 Гр и дозы хронического облучения костного мозга и мягких тканей.
6. В качестве одного из факторов, определяющих более редкую регистрацию случаев повышения радиочувствительности у облучённых лиц, может рассматриваться снижение уровня апоптотической гибели клеток под влиянием хронического облучения ККМ (в диапазоне доз от 0,21 Гр до 1,42 Гр) и мягких тканей (в диапазоне от 0,01 Гр до 0,14 Гр).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Пушкарёв С.А., Аклеев А.В. Адаптационные способности лимфоцитов периферической крови у людей, подвергшихся хроническому облучению // Опыт преодоления последствий техногенных аварий и развитие атомных технологий: материалы научно-практической конференции, посвящённой 50-летию аварии на ПО «Маяк», 25-26 сентября 2007 г. - Челябинск, 2007. – С. 179 - 180.

Аклеев А.В., Пушкарёв С.А. Механизмы поддержания генетического гомеостаза облучённых клеток и адаптивный ответ // Проблемы радиоэкологии и пограничных дисциплин / Под ред. В.И. Мигунова, А.В. Трапезникова. – Екатеринбург, 2007.- Вып. 11. – С. 68 - 110.

Аклеев А.В., Крестинина Л.Ю., Варфоломеева Т.А., Остроумова Е.В., Пушкарёв С.А., Шалагинов С.А., Худякова О.И., Веремеева Г.А., Возилова А.В., Холл П. Медико-биологические эффекты хронического воздействия ионизирующей радиации на человека // Медицинская наука и образование Урала.- 2008. - №2. – С. 8 - 10.

Пушкарёв С.А., Аклеев А.В. Адаптационные возможности лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому воздействию ионизирующей радиации // Вестник Челябинского государственного университета. Научные труды. – 2008. - №4. - С. 95 – 99.

Аклеев А.В., Пушкарёв С.А., Веремеева Г.А. Фрагментация ДНК в лимфоцитах периферической крови лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: материалы II международной научно-практической конференции, 8 - 11 октября 2008 г.: в 2 т. Т. 1 – Челябинск, 2008. – С. 96 – 98

Аклеев А.В., Пушкарёв С.А. Роль апоптоза и репарации ДНК в формировании адаптивного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. – 2008. - №11. – С. 276 – 285.