

Б. С. Федоренко<sup>1</sup>, д-р мед. наук, С. В. Дружинин<sup>1</sup>, канд. биол. наук,  
 Г. П. Снигирева<sup>2</sup>, канд. биол. наук, Н. Н. Новицкая<sup>2</sup>, А. Н. Богомазова<sup>2</sup>,  
 канд. биол. наук, В. А. Шевченко<sup>3</sup>, д-р биол. наук, А. В. Рубанович<sup>3</sup>, канд. биол. наук,  
 В. В. Цетлин<sup>1</sup>, д-р техн. наук, В. А. Бондаренко<sup>1</sup>

## ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ФАКТОРАМИ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

<sup>1</sup>Государственный научный центр — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва,

<sup>2</sup>Российский научный центр рентгенорадиологии МЗ РФ, Москва,

<sup>3</sup>Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

Анализ повреждений хромосом в лимфоцитах крови человека является наиболее объективным и разработанным методом биологической дозиметрии. В частности, в настоящее время он широко используется для ретроспективной оценки доз ионизирующего излучения у населения, проживающего в регионах, пострадавших в результате длительных испытаний ядерного оружия, а также при чрезвычайных ситуациях.

Чтобы получить объективную информацию о полученной дозе, цитогенетическое исследование должно быть проведено в возможно короткие сроки после облучения. По количеству aberrаций хромосомного типа — дицентрики и центрические кольца, которые являются маркерами радиационного воздействия, с помощью калибровочной кривой доза-эффект можно оценить дозу облучения, полученную человеком [1]. Частота клеток, несущих дицентрики и центрические кольца, со временем после облучения снижается, т. к. такие клетки постепенно элиминируют из кровеносного русла. В связи с этим оценить дозу по частоте дицентриков спустя годы после радиационного воздействия становится достаточно проблематично. Поэтому в случаях хронического или пролонгированного облучения правильнее говорить не о био-

логической дозиметрии как таковой, а об индикации радиационного воздействия. Для ориентировочной оценки степени радиационного воздействия можно использовать калибровочные кривые доза-эффект для острого однократного облучения. Однако при этом необходимо вводить поправочные коэффициенты, которые учитывают характер и условия радиационного воздействия, а также время, прошедшее после облучения. Так, при оценке доз хронического облучения обычно используют поправочный коэффициент 2–3 [2].

При оценке доз хронического, пролонгированного или фракционированного облучения более информативным является анализ симметричных транслокаций, оцененный с помощью флуоресцентного метода окрашивания хромосом после гибридизации *in situ* с хромосом-специфичными ДНК-пробами (FISH-метод). Уровень транслокаций в отличие от дицентриков и центрических колец остается постоянным практически в течение всей жизни человека.

Несмотря на то, что физическая дозиметрия всегда является неотъемлемой частью космических полетов (КП), биологические методы оценки доз космической радиации не теряют своего значения. В отличие от физической дозиметрии результаты биологичес-

кой дозиметрии отражают общую реакцию организма человека на облучение, поэтому они имеют прогностическое значение. При этом преобладающее значение приобретает не столько величина поглощенной дозы, сколько оценка полученного повреждения.

Целью проведенного исследования явилось изучение влияния факторов космического полета на частоту цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови человека.

Задачи исследования предусматривали:

— исследование спонтанного уровня хромосомных нарушений в лимфоцитах крови космонавтов в дополетном периоде;

— анализ частоты хромосомных повреждений и их типов в лимфоцитах крови космонавтов после космических полетов различной продолжительности;

— оценка возможности использования цитогенетического анализа нестабильных aberrаций хромосом (дицентриков и центрических колец) для определения индивидуальных поглощенных доз космического излучения;

— изучение частоты стабильных aberrаций хромосом (симметричных транслокаций) в лимфоцитах крови космонавтов после космических полетов различной продолжительности;

— исследование влияния длительной антиортостатической гипокинезии (АНОГ), являющейся моделью невесомости в земных условиях, на уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови испытуемых;

— изучение влияния эмоционального стресса на частоту хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови испытуемых, находившихся в условиях длительной изоляции в замкнутом пространстве, моделирующем условия космического полета на Международной космической станции (эксперимент SFINCSS-99).

Культивирование лимфоцитов и анализ хромосомных aberrаций проводили по стандартной методике с некоторыми модификациями. У каждого обследуемого стремились анализировать 1000 метафазных клеток. Учитывали все обнаруженные типы aberrаций хромосом без кариотипирования. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием стандартных статистических программ. Достоверность межгрупповых различий оценивали при помощи точного критерия Фишера и *t*-критерия Стьюдента.

Для анализа стабильных aberrаций использовали коктейль проб: меченные биотином ДНК-пробы для 1, 4 и 12 хромосом в комбинации с меченной дигоксигенином панцентромерной пробой. Оба метода приготовления препаратов для цитогенетического анализа изложены в работе [3]. Всего было проанализировано от 199 до 3256 клеток, окрашенных FISH-методом. Учитывали полные и неполные транслокации.

Известно, что в лимфоцитах практически каждого здорового человека в норме содержится определенное количество aberrаций хромосом. По данным различных авторов, их частота варьирует от

0 до 5 %, составляя в среднем около 1 %. При этом примерно 95 % от общего количества aberrаций составляют одиночные и парные фрагменты. Достаточно низкими значениями характеризуется спонтанный уровень дицентриков и центрических колец у людей, которые не имели контакта с источниками ионизирующего излучения (0,2–2 на 1000 клеток).

В табл. 1 представлены результаты изучения фонового (до первого космического полета) уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови космонавтов. Здесь же приведены средние значения хромосомных aberrаций в группе космонавтов, обследованных перед повторными полетами, а также контрольный уровень aberrаций хромосом (жители Московской области) [4].

Обращает на себя внимание более высокий фоновый уровень aberrаций хромосомного типа у космонавтов, обследованных до первого полета, по сравнению с жителями Московской области. Так, частота дицентриков в 7,5 раза превышает контрольный уровень, а частота парных фрагментов (ацентриков) почти в 2 раза выше аналогичного показателя. Причины повышенного уровня дицентриков парных фрагментов у космонавтов не совсем ясны. Можно предположить, что это связано с более частыми рентгенодиагностическими процедурами в период предполетной подготовки, но этот вопрос требует специального изучения.

Было выявлено, что в среднем частота дицентриков и центрических колец у космонавтов перед повторными полетами составляет  $0,17 \pm 0,04$  на 100 клеток, т. е. практически не отличается от уровня этих повреждений, наблюдаемых в группе космонавтов до первого космического полета. Частота других типов хромосомных aberrаций также не

отличается от дополетного уровня. Таким образом, уровень хромосомных aberrаций за период между полетами постепенно возвращается к исходному дополетному значению.

После космических полетов общая частота хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови космонавтов достоверно возрастает, в основном за счет дицентриков и центрических колец (табл. 2). В частности, частота клеток с дицентриками и центрическими кольцами после КП увеличивается до  $0,43 \pm 0,05$ , превышая дополетный уровень ( $0,15 \pm 0,03$ ) почти в 3 раза. В то же время уровень парных фрагментов и aberrаций хроматидного типа по сравнению с дополетным практически не изменяется, составляя  $0,65 \pm 0,07$  и  $0,68 \pm 0,07$  до полетов и  $0,75 \pm 0,06$  и  $0,76 \pm 0,06$  после полетов на 100 клеток соответственно. В целом прослеживается тенденция к волнообразному изменению указанных параметров, т. е. происходит увеличение частоты aberrаций после первого полета по отношению к фоновому уровню, затем примерно через 2,5 года — ее уменьшение, за которым вновь следует увеличение количества хромосомных aberrаций после каждого очередного полета и т. д. Это связано с тем, что aberrации хромосом, индуцированные ионизирующим излучением в космосе, накапливаются за время полета, а после него клетки, содержащие хромосомные aberrации, естественным образом элиминируются из циркулирующей крови.

Для оценки индивидуальных поглощенных доз у космонавтов по частоте хромосомных нарушений была использована калибровочная кривая доза-эффект для дицентриков [3], построенная на основании данных экспериментального исследования, кото-

Таблица 1

**Частота aberrаций хромосом на 100 клеток у космонавтов до первого полета и перед повторными полетами**

Показатели	Контроль	Космонавты до первого КП	Космонавты перед повторными КП
Дицентрики и центрич. кольца	0,02±0,01	0,15±0,03*	0,17±0,04
Ацентрики	0,35±0,03	0,65±0,07*	0,65±0,08
Хроматидные aberrации	0,59±0,07	0,68±0,11	0,91±0,09
Общая частота хромосомных aberrаций	0,85±0,04	1,47±0,10*	1,65±0,13
Число обследованных людей/клеток	118/48124	17/13639	10/10410

Примечание. \* — Достоверные различия с контрольной группой (P<0,05).

Таблица 2

**Результаты цитогенетического обследования космонавтов в до- и послеполетный периоды (частота aberrаций на 100 клеток)**

Цитогенетический показатель	До полета	После полетов
Количество обследованных космонавтов	17	21
Количество проанализированных метафаз	13639	20058
Частота хромосомных aberrаций на 100 клеток	1,52±0,11	2,06±0,10
Частота клеток с дицентриками и центрич. кольцами на 100 клеток	0,15±0,03	0,42±0,05
Частота дицентриков и центрич. колец на 100 клеток	0,15±0,03	0,43±0,05
Частота ацентриков на 100 клеток	0,65±0,07	0,75±0,06
Частота aberrаций хроматидного типа на 100 клеток	0,68±0,07	0,76±0,06

рая описывается линейно-квадратичным уравнением:

$$y = 0,001 + 0,015x + 0,063x^2$$

На основе результатов физической дозиметрии и биологической оценки доз для обследуемых космонавтов, рассчитанных по частоте дицентриков для обследуемой группы космонавтов, были определены индивидуальные значения доз в диапазоне от 0,02 до 0,32 Гр. Индивидуальные дозы космонавтов за полет, измеренные с помощью термолюминесцентных дозиметров, варьировали от 0,024 до 0,095 Гр [5]. Следует подчеркнуть, что в данной работе оценка дозы проведена без учета фактора мощности дозы, расчет доз выпол-

нялся по кривой, полученной для острого облучения.

Одиннадцать космонавтов были обследованы с помощью FISH метода. У большинства из них частота транслокаций превышает контрольный уровень (0,15±0,03 на 100 клеток) как в дополетном, так и в послеполетном периодах. Причем у трех космонавтов до полета и у четырех после полета были отмечены достоверные различия с контролем. Более высокий дополетный уровень транслокаций наблюдался у космонавтов, которые уже совершили один или несколько космических полетов. Имела место тенденция к увеличению частоты транслокаций с увеличением суммарной дозы

космического излучения за несколько полетов. Однако из-за небольшого количества наблюдений говорить о каких-либо закономерностях на основании полученных данных не представляется возможным, а результаты этой части исследования следует считать предварительными.

Среди других факторов КП изучено влияние на спонтанный уровень хромосомных aberrаций невесомости в модельном эксперименте АНОГ и психоэмоционального стресса с длительной полной изоляцией испытуемых (эксперимент SFINCSS-99).

Объектом исследования в эксперименте АНОГ являлись 13 практически здоровых испытуемых-добровольцев в возрасте от 23 до 42 лет, находившихся в течение 60 и 120 суток в условиях моделированной невесомости под углом наклона -6° (постельный режим, голова ниже ног).

Одна группа испытуемых (6 человек) находилась в условиях АНОГ на протяжении 120 суток. Испытуемые второй группы (7 человек) находились в условиях 60-суточной АНОГ и применяли ранее разработанное индивидуальное средство профилактики циркуляторных нарушений в виде комбинезона со встроенной системой нагрузки опорно-двигательного аппарата под названием «Пингвин». Из них 4 обследуемых ежедневно носили костюм в полном комплекте с включением всех нагрузочных элементов. Они применяли динамический режим ношения костюма (упражнения на разгибание в коленном суставе) прямо в постели, тогда как остальные 3 обследуемых также носили полный комплект костюма в течение 10 ч в сутки с применением динамического режима физических упражнений в течение 15 мин ежедневно на фоне АНОГ, но с отключенным нагрузочным элементом, обеспечивающим

растяжение экстензоров мышц голени.

После пребывания в условиях 60-суточной гипокинезии с применением мер профилактики было показано, что частота aberrаций хромосом находилась в пределах фонового уровня.

Результаты цитогенетического анализа испытуемых после 120-суточной АНОГ без применения профилактических методов и средств свидетельствуют о повышении частоты ацентрических парных фрагментов в два раза.

Научная программа исследований SFINCSS-99 по изучению влияния длительной изоляции в герметичном замкнутом пространстве, моделирующая условия полета Международной космической станции (МКС), на организм человека проводилась по следующей схеме. Экипажи размещались в двух модулях объемом 100 и 200 кубометров соответственно. Обе части системы были соединены между собой, моделируя, таким образом, российский и другие сегменты МКС, что позволяло экипажам контактировать и выполнять совместные работы. Были сформированы три группы испытуемых, отобранных по критериям медицинского отбора космонавтов. Одна из них (4 человека) находилась в условиях изоляции 240 суток, а две другие группы (3 и 4 человека) — 110 суток. Они отличались между собой в основном интенсивностью режима выполнения работ.

В ходе эксперимента моделировались основные условия КП (за исключением невесомости и радиации): изоляция и замкнутый объем, параметры окружающей среды, включая состав атмосферы, давление, влажность воздуха, температура, шум и т. д. Основные полетные операции включали монтаж и стыковку, коммуникацию с наземными службами, питание, санитарно-гиги-

нические проблемы. Исследователи моделировали также возможные трудные ситуации в полете. Взятие крови для цитогенетического исследования проводилось непосредственно перед началом эксперимента, в середине и после его окончания.

В середине эксперимента в группе испытуемых на 55-е сутки произошло существенное увеличение частоты ацентриков (с  $0,30 \pm 0,10$  до  $0,47 \pm 0,18$  на 100 клеток).

Если сгруппировать данные цитогенетического обследования всех испытуемых по времени его проведения, то можно отчетливо наблюдать тенденцию увеличения частоты хромосомных aberrаций от времени нахождения в условиях изоляции. Таким образом, можно видеть, что чем больше времени прошло от начала изоляции, тем выше уровень ацентрических хромосомных и хроматидных aberrаций.

Исходя из полученных данных, можно прийти к заключению о том, что экстремальное воздействие на организм человека факторов КП различного характера приводит к определенным изменениям в хромосомном аппарате клетки.

После космических полетов происходит статистически значимое повышение средней частоты дицентриков и центрических колец в лимфоцитах крови космонавтов по сравнению с дополетным уровнем. Частота парных фрагментов и aberrаций хроматидного типа после КП не изменяется. В межполетном периоде происходит постепенное снижение частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах крови.

Оценка индивидуальных доз у космонавтов методом биодозиметрии показала, что они находятся в диапазоне от 0,02 до 0,32 Зв.

Длительная антиортостатическая гипокинезия также приводит к увеличению частоты aberrаций хромосомного ти-

па, но это относится лишь к парным фрагментам. Цитогенетический анализ лимфоцитов крови испытуемых, находившихся на протяжении 60 суток в условиях гипокинезии с применением профилактического нагрузочного костюма «Пингвин» совместно с физическими упражнениями, не выявил статистически достоверного изменения частоты aberrаций хромосом по сравнению с фоном.

После нахождения в условиях изоляции с внешним миром, моделирующих режим космического полета на МКС, в лимфоцитах крови испытуемых выявлено статистически значимое увеличение частоты парных хромосомных фрагментов и частоты одиночных хроматидных фрагментов по сравнению с контрольным уровнем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко В. А., Снигирева Г. П. Цитогенетические последствия воздействия ионизирующих излучений на популяцию человека / Под ред. Е. Б. Бурлаковой // Последствия Чернобыльской катастрофы — М., 1996.
2. United Nations. Ionizing radiation. Sources and biological effects. UNSCEAR 1982, report to General Assembly with annexes // United Nations sales publication. E.82. 1982. United Nations. — N.Y., 1982.
3. Снигирева Г. П., Хаймович Т. И., Шевченко В. А. Использование цитогенетических методов для биологической дозиметрии: Метод. рекомендации / РФЯЦ-ВНИИЭФ. — Саров, 2003. — 55 с.
4. Изучение цитогенетических эффектов у профессионалов-атомщиков г. Сарова / Г. П. Снигирева, А. Н. Богомазова, Н. Н. Новицкая и др. // Труды Междунар. конф. «Генетические последствия чрезвычайных ситуаций». Москва, 10-13 июня 2002 г. — М.: Изд-во РУДН, 2002. — С. 313-328.
5. Акатов Ю. А., Архангельский В. В., Петров В. М. Индивидуальные дозы космонавтов на орбитальной станции «Мир» за период ее функционирования // Тез. докл. XI конф. по косм. биологии и авиакосм. медицине. Москва, 22-26 июня 1998 г. — Т. 1. — М.: Слово, 1998. — С. 15.

УДК [57+61]539.1.04

Б. С. Федоренко, С. В. Дружинин, Г. П. Снигирева, Н. Н. Новицкая, А. Н. Богомазова, В. А. Шевченко, А. В. Рубанович, В. В. Цетлин, В. А. Бондаренко

#### ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ФАКТОРАМИ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Исследования цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови космонавтов свидетельствуют о статистически значимом повышении частоты радиационно-зависимых аберраций хромосом (дигцентриков и центрических колец). При изучении влияния антиортогостатической гипокинезии (модель невесомости на Земле) в лимфоцитах испытуемых увеличивалась частота ацентрических фрагментов. В результате психоэмоционального стресса (длительная изоляция) отмечалось увеличение числа ацентрических фрагментов и хроматидных аберраций. Предполагается, что каждый из изученных факторов космического полета способен вызывать повышение определенного вида повреждений хромосом.

**Ключевые слова:** космонавты, факторы космического полета, лимфоциты, аберрации хромосом.

UDC [57+ 61]539.1.04

B. S. Fedorenko, S. V. Druzhinin, G. P. Snigiryova, N. N. Novitskaya, A. N. Bogomazova, V. A. Shevchenko, A. V. Rubanovich, V. V. Tsetlin, V. A. Bondarenko

#### CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES INDUCED BY SPACE FLIGHT FACTORS

Cytogenetic studies of chromosomal damage in cosmonauts' blood lymphocytes showed a statistically significant increase in the yields of radiation-dependent chromosomal aberrations (dicentrics and centric rings). The influence of antiorthostatic hypokinesia (simulated weightlessness) results in an increase in the frequency of acentric aberrations. Psycho-emotional stress (long-term isolation) is found to lead to increased yields of acentric fragments and chromatid aberrations. It is supposed that each space factor under consideration can induce chromosome damage of a certain type.

**Key words:** cosmonauts, space flight factors, lymphocytes, chromosomal aberrations.

УДК 616.45-001.1/3:616-008.93

В. М. Єльський, чл.-кор. АМН України, д-р мед. наук,

І. І. Зінкович, д-р мед. наук, О. Д. Якубенко, канд. біол. наук

## РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ В РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕСУ

Донецький державний медичний університет ім. М. Горького

Сьогодні не викликає сумніву те, що стан вільнорадикального окислення (інтенсивність ліпопероксидації) та сила антирадикального захисту є не лише маркерами вираженості стресорних реакцій, але й відображають ефективність функціонування саногенетичних механізмів, особливості адаптації організму до дії екстремальних факторів [6; 12]. Конкретні ж механізми, які зв'язують вільнорадикальне окислення, з одного боку, і комплекс стресорних реакцій, з другого, все ще залишаються малодослідженими.

Мета роботи — отримання доказів впливу вільнорадикальних реакцій на чутливість тканин до симпатоміметиків як одного з пускових факторів стресорних реакцій організму [7].

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на препаратах ізольованого міокарда 75 білих щурів-самців

масою тіла 190–250 г, яких перфузували ретроградно через аорту впродовж 60 хв при 37°C зі швидкістю 30 мл/год. Виконано 6 серій експериментів різних за складом перфузійного розчину. У контролі (17 препаратів) міокард перфузували фізіологічним розчином; у 1-й дослідній серії (24 препарати) до перфузату додавали ізопротеренол кінцевою концентрацією 10 мкмоль/л; у 2-й серії (12 препаратів) — сірчанокисле залізо концентрацією 25 мкмоль/л; у 3-й серії (6 препаратів) перфузат являв собою суміш ізопротеренолу та двовалентного заліза у тих же концентраціях; перфузат 4-ї серії (7 препаратів) — розчин супероксиддисмутази (СОД) концентрацією 50 мг/л; 9 препаратів 5-ї серії перфузували сумішшю ізопротеренолу та СОД у тих же концентраціях. У перфузаті, який відтікав від міокарда, спектрофотометрично [2] оцінювали інтен-

сивність ліпопероксидації за рівнями дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), а також силу антирадикального потенціалу за вмістом у перфузаті  $\alpha$ -токоферолу ( $\alpha$ -ТФ), активності каталази та СОД. Чутливість міокарда до ізопротеренолу оцінювали за виходом у перфузат загального білка (ЗБ), молекул середньої маси (МСМ), загальних ліпідів (ЗЛ), фосфоліпідів (ФЛ), неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК); активації лізосомальних ензимів катепсину Д (КД) і кислотої фосфатази (КФ); кардіальних ферментів креатинкінази (КК) та лактатдегідрогенази (ЛДГ). Окрім цього, через 20, 40 і 60 хв експерименту імуноферментним методом у перфузаті визначали вміст циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на ПЕОМ за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм.