

УДК 575.224.4:614.876

## О ВОЗМОЖНОСТИ НЕСТОХАСТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ РАДОНОМ В ЭКВИВАЛЕНТНЫХ РАВНОВЕСНЫХ ОБЪЕМНЫХ АКТИВНОСТЯХ 200 И 400 БК/М<sup>3</sup> ЗЕБРИНЫ ПОВИСЛОЙ (ZEBRINA PENDULA SCHNIZL.)

© 2001 г. В.Н. Калаев, А.К. Буторина, А.В. Мильшин, В.М. Вахтель, А.Г. Бабенко

*Воронежский государственный университет*

Проведены исследования цитогенетических показателей (митотической активности, уровня и спектра нарушений митоза, ядрышковых характеристик) в корнях *Zebrina pendula Schnizl.* при облучении эквивалентными равновесными объемными активностями (ЭРОА) радона 200 и 400 Бк/м<sup>3</sup>, являющимися предельно допустимыми для жилых и нежилых помещений соответственно. Показано, что указанные активности вызывают в клетках корней нарушения цитогенетических характеристик: изменяется время прохождения клетками стадий митоза, увеличивается доля остаточных ядрышек в интерфазе и число многоядрышковых клеток, появляются амитозоподобные фигуры. Рассматривается изменение указанных цитогенетических показателей с точки зрения работы системы checkpoint-репарации. Обсуждается вопрос о необходимости проведения исследований в области изучения биологических эффектов радона при его содержании в воздухе в пределах ПДК и возможности пересмотра допустимых норм в сторону снижения.

Вклад радона в суммарную эффективную дозу для населения России (4–5 мЗв/год) составляет 40–50 %, для жителей некоторых районов он может достигать до 92 % [1]. По данным разных авторов, радон ответственен за 6 – 20 % случаев рака легких [2, 3, 4, 5]; есть сведения и о мутагенности радона [6]; по данным Дубинина, радон дает дозу на гонады в год 0,002 рад [7]; проведенный в Швеции регрессионный анализ выявил слабую корреляцию между уровнем содержания радона в жилых помещениях и встречаемостью случаев заболевания раком легких у молодежи [8].

Совместное действие на организм радона, его дочерних продуктов и ряда факторов нерадиационной природы (пыль, выхлопные газы двигателей, продукты сгорания табака [9, 10, 11, 12, 13], электромагнитные поля [14]) усиливает неблагоприятные эффекты, обусловленные этими факторами.

Следует особо подчеркнуть, что рядом исследователей [15, 16] отмечен обратный дозозависимый канцерогенный эффект действия радона. Однако в тестах на индукцию генных мутаций радон обуславливает увеличение их числа пропорционально дозе, хотя низкие дозы обладают относительно высокой биологической эффективностью. Данное явление объясняется радиационной стерилизацией клеток при высоких дозах и их повреждением – при низких [16].

Эти факты указывают на то, что проблема радона является ведущей проблемой обеспечения радиаци-

онной безопасности населения и на необходимость уделять повышенное внимание отслеживанию низких доз радона ввиду высокого уровня канцерогенного риска при их воздействии на человека.

Несмотря на многочисленные исследования, выполненные на животных [12, 17 и др.], и исследования выборок людей, проживающих в радоноопасных районах или профессионально сталкивающихся с высокими активностями радона [18, 19, 20, 21, 22, 23 и др.], доказывающие канцерогенное и генотоксическое действие радона, существует мнение о сильном преувеличении радоновой опасности [24, 25, 26 и др.]. Сущность этих споров можно свести к вопросу «Существуют ли стохастические или нестохастические биологические эффекты в области низких эквивалентных равновесных объемных активностей (ЭРОА) радона?» На сегодняшний день эффекты обнаружены при концентрациях 10<sup>3</sup> – 10<sup>5</sup> Бк/м<sup>3</sup> [27, 28].

Интересным направлением в области изучения влияния радона на живые организмы является создание биологических систем дозиметрии, которые позволили бы оценить не только ЭРОА радона, но и выявить синергические эффекты от облучения указанным благородным газом и мутагенов/кластогенов, находящихся в окружающей среде. До сих пор не было создано эффективных биологических тест-систем, которые позволили бы выявить эквивалентную равновесную объемную активность (ЭРОА) радона в

помещениях или оценить совокупные биологические эффекты от радона и других факторов (химической или физической природы), чтобы по вызванному эффекту определить риск для людей, проживающих в указанных помещениях, хотя такие попытки за рубежом предпринимались (Bauchinger et al., 1996).

В странах Европейского союза установлены следующие нормы содержания радона в жилых помещениях: 200 Бк/м<sup>3</sup> для новых и 400 Бк/м<sup>3</sup> для старых зданий, 1000 Бк/м<sup>3</sup> – для нежилых помещений [30, 31]. Считается, что указанные активности не могут вызывать увеличения частоты встречаемости в выборках людей рака легких, т.е. рассматриваются стохастические эффекты радоновой радиации. Появление нестохастических эффектов считается возможным при активностях радона, превышающих ПДК на порядок.

Ранее нами была впервые разработана шкала для дозиметрии радона в жилых помещениях с использованием в качестве тест-объекта растения *Zebrina pendula* Schnizl. [32, 33]. Однако нижняя граница, которая позволяла определить ЭРОА радона с использованием этого тест-объекта, составляла 1800 Бк/м<sup>3</sup> (в корнях у растения наблюдалось увеличение ядрышковой активности и появлялись остаточные ядрышки на стадии метафазы – телофазы митоза). Нами было высказано предположение, что при снижении ЭРОА будет происходить только повышение ядрышковой активности. Однако, исследования по выявлению нижней границы чувствительности к загрязнению радоном указанного тест-объекта и возможности возникновения нестохастических цитогенетических эффектов при облучении ПДК радона (в связи с приведенными выше данными этот вопрос приобретает особое значение) нами не проводились. Поэтому была предпринята попытка провести изучение цитогенетических реакций *Zebrina pendula* при облучении ЭРОА радона 200 и 400 Бк/м<sup>3</sup>.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника радона использовали сернокислый уран. В колпаках объемом 0,5 м<sup>3</sup> создавались ЭРОА радона 200 и 400 Бк/м<sup>3</sup>. Определение ЭРОА радона в воздухе проводилось на основе данных статистического способа путем измерения радиометром РГГ-01 радиоактивности, накопленной в течение 3–4 суток угольным сорбентом из воздуха, а также динамическим способом-путем прокачивания воздуха с радоном и его дочерними продуктами распада через фильтр и измерения их альфа-активности с помощью радиометра РГА-01Т. Отростки *Zebrina pendula* Schnizl. длиной 10 – 12 см помещали в стандартные 0,75 л стеклянные банки с водопроводной водой на 14 дней. Воду в банке отделяли от атмосферного воздуха двумя плотно подогнанными слоями полиэтилене

на (подсос воздуха через отверстия в полиэтилене для побегов не допускался). Фиксацию отросших корней проводили в 15 часов (летнее время) в ацетоалкоголе, в нем же материал хранили при температуре +4 °С. Изготовление микропрепаратов проводили по описанной нами ранее методике [34]. На препарате просматривалось не менее 400 клеток. На окрашенных ацетогематоксилином микропрепаратах велся подсчет митотической активности – доли делящихся клеток от общего их числа (%); доли клеток на стадии профазы, метафазы, анафазы-телофазы от общего числа делящихся клеток (%); нарушений митоза – % клеток с патологиями митоза от общего числа метафазных, анафазных, телофазных клеток; остаточных ядрышек в митозе и в интерфазе – % клеток с остаточным ядрышком от общего количества клеток в мета-, ана-, телофазе и % клеток с остаточным ядрышком от общего числа интерфазных клеток соответственно; ядрышковой активности – % клеток с *n* ядрышками от общего числа неделящихся клеток; количество ядрышек на клетку, амитозоподобных фигур – % клеток с амитозоподобными фигурами от числа нормально делящихся клеток.

Классификацию нарушений митоза проводили по Алову [35].

Всего было проанализировано в контроле 11 микропрепаратов (6033 клеток); при облучении ЭРОА радона 200 Бк/м<sup>3</sup> – 12 препаратов (9348 клеток); при облучении ЭРОА радона 400 Бк/м<sup>3</sup> – 11 препаратов (8945 клеток).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием угловой трансформации долей (*j*-преобразование Фишера) и введением поправки Йейтса по Лакину [36]. Выявление параметрической (коэффициент корреляции Пирсона (*r*)) и непараметрической (коэффициент корреляции Спирмена (*r<sub>s</sub>*)) корреляции между цитогенетическими показателями проводилось с использованием пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [37].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по цитогенетическим показателям *Zebrina pendula* в норме и после облучения радоном в ЭРОА 200 и 400 Бк/м<sup>3</sup> приведены в таблице. Эксперименты по облучению радоном зебрины повислой показали, что указанные активности не вызывают достоверных изменений митотической активности. Это можно объяснить значительной резистентностью данного цитогенетического показателя к радиационному воздействию. Такого рода закономерность отмечалась в работах Крышева с соавт. [2], Буториной и Калаевым [34]. Однако анализ распределения клеток по стадиям митоза показывал, что происходит достоверное увеличение доли анафазных и телофазных клеток, а также

Цитогенетические показатели в корнях *Zebrina pendula* Schnizl. в норме и при облучении радоном

Цитогенетический показатель	Контроль	ЭРОА радона, Бк/м <sup>3</sup>	
		200	400
Митотическая активность, %	10,4	10,6	9,6
% профаз	58,7	54,2	54,8
% метафаз	24,7	20,9	26,5 <sup>1</sup>
% анафаз и телофаз	17,9	23,2*	22,2*
Нарушения митоза, %	5,4	2,4	1,3
% амитозоподобных фигур	6,0	13,4	5,8
Количество ядрышек на клетку	1,47	1,47	1,43
% мета-, ана-, телофазных клеток с остаточным ядрышком	9,7	7,5	5,9
% клеток с остаточным ядрышком в интерфазе	0,2	0,04	3,9** <sup>2</sup>

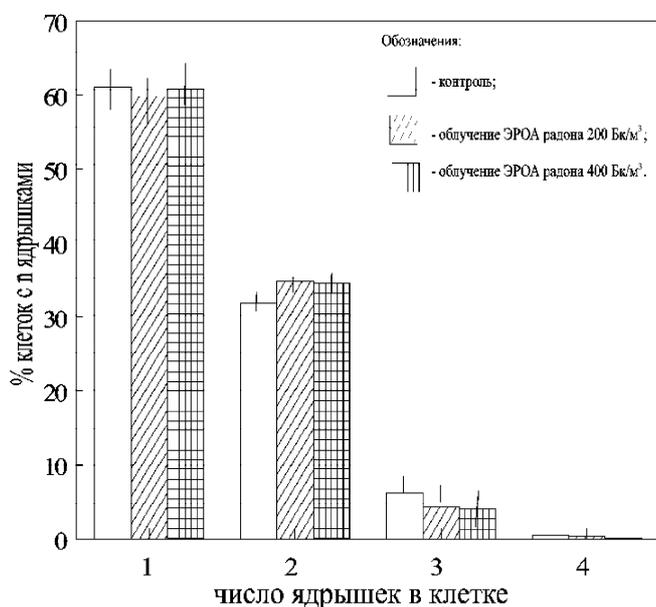
## Обозначения:

\* – различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ ); \*\* – различия с контролем достоверны ( $P < 0,001$ );

<sup>1</sup> – различия с 200 Бк/м<sup>3</sup> достоверны ( $P < 0,01$ ); <sup>2</sup> – различия с 200 Бк/м<sup>3</sup> достоверны ( $P < 0,001$ ).

уменьшение доли метафазных клеток в опыте по облучению ЭРОА радоном 200 Бк/м<sup>3</sup> по сравнению с долей метафаз в опыте по облучению активностью 400 Бк/м<sup>3</sup>. Указанные эффекты связаны с изменением времени формирования веретена деления и блокированием процессов расхождения хромосом к полюсам и цитокинеза. Такого рода задержка клеток может быть индуцирована действием механизмов checkpoint-репарации, которые обуславливают образование блоков при прохождении клетками критических стадий митотического цикла. К этим стадиям относится переход клеток из метафазы в анафазу и из телофазы в стадию G<sub>1</sub>; checkpoint-репарация существует также при прохождении клетками анафазы (точка проверки целостности генетического материала клетки – mid-anaphase-checkpoint) [38]. Аналогичные эффекты задержки клеток при переходе из метафазы в анафазу и процессов цитотомии были обнаружены нами у семенного потомства дуба черешчатого в условиях антропогенного загрязнения и в норме в течение суток (они обеспечивают регулярность прохождения клетками стадий митоза и обеспечивают процессы морфогенеза корня) [39]. Особо стоит отметить наличие амитозоподобных фигур, которые могут явиться результатом реституции ядер (или ядра и микроядра), а также деструкции ядерной мембраны при стрессовом воздействии. Наличие такого рода эффектов в контроле можно связать с наличием кластогенов в водопроводной воде. Однако резкий рост доли амитозоподобных фигур при облучении ЭРОА 200 Бк/м<sup>3</sup> (наблюдается достоверное снижение доли нормально делящихся клеток ( $P < 0,001$ )) скорее всего обусловлен синергическими эффектами радиотоксинов, образующихся в результате радонового облучения в листьях и мигрирующих в корни, и кластогенов, содержащихся в водопроводной воде. Зна-

чительный рост амитозоподобных фигур при ЭРОА радона 200 Бк/м<sup>3</sup> и отсутствие различий при 400 Бк/м<sup>3</sup> хорошо согласуется с высказанной ранее рядом авторов [40, 41, 42, 43] гипотезой о возможности возникновения синергических эффектов при определенном сочетании взаимодействующих компонентов. Повышение или понижение концентрации одного из компонентов системы приводит к исчезновению эффекта синергизма. Возможно именно этим объясняется отсутствие эффекта при воздействии ЭРОА радона 400 Бк/м<sup>3</sup>. О замене процесса митоза на амитоз свидетельствует существенная отрицательная корреляция между % амитозов и митотическим индексом ( $r = -0,346$ ;  $P < 0,05$ ). Вероятно, замена митоза на амитоз индуцировала тенденцию к снижению нарушений митоза, т.е. возникающие повреждения не позволяют клетке перейти на следующую стадию митотического деления, и она начинает делиться амитотическим путем. Существенных различий в спектре нарушений митоза между контролем и опытом не обнаружено. Он был представлен мостами, отставанием хромосом в метакинезе и анафазе, случаями агглютинации. Среди отклонений от физиологической нормы протекания митоза нами было выявлено появление остаточного ядрышка на стадии метафазы, анафазы и телофазы митоза. Причем в опыте наблюдается снижение, хотя и недостоверное, числа остаточных ядрышек. Наблюдается положительная корреляция между частотой встречаемости остаточных ядрышек и митотическим индексом ( $r = 0,435$  ( $P < 0,05$ )), а также нарушениями митоза ( $r_s = 0,269$  ( $P < 0,05$ )) и отрицательная – между встречаемостью остаточных ядрышек и частотой амитозоподобных фигур ( $r_s = -0,633$  ( $P < 0,001$ )). На наш взгляд, корреляционные связи свидетельствуют об адаптивной роли остаточных ядрышек в условиях стрессового воздействия, обусловлен-



**Рис.** Частота встречаемости клеток с различным числом ядрышек в ядре у *Zebrina pendula* Schnizl. в норме и при облучении ЭРОА радона 200 и 400 Бк/м³

ного радоновым облучением. Увеличение доли митозов с остаточным ядрышком, которые свидетельствуют о пuffedинге рибосомальных генов на стадии метафазы – телофазы митоза, помогает поддерживать высокий уровень метаболизма и тем самым – высокие значения митотической активности, обеспечивающей морфогенез корня. Скорее всего, появление остаточных ядрышек связано с возрастанием доли нарушений митоза, что было выявлено методами корреляционного анализа. Обнаружение остаточных ядрышек свидетельствует об активации рибосомальных генов, которые обеспечивают синтез белков checkpoint-репарации, восстанавливающих целостность генетического материала клеток меристематической ткани и блокирующих переключение с непрямого на прямое деление клетки.

Также в опыте обнаружен феномен остаточного ядрышка в интерфазе митоза, причем статистически достоверное увеличение их числа происходит при облучении ЭРОА радона 400 Бк/м³. Это указывает на возможность нестохастических цитогенетических эффектов при воздействии ПДК радона в воздухе. Данный феномен можно объяснить как крайнюю степень активации рибосомальных генов, на которых образуются остаточные ядрышки, функционирующие относительно обособлено от основного ядра в результате репликации рДНК.

Подсчет числа ядрышек на клетку не выявил достоверного влияния фактора облучения на частоту встречаемости ядрышек. Однако в опыте наблюдается рост доли клеток с двумя ядрышками в ядре по сравнению с контролем (рисунок). Это можно рассматривать как усиление транскрипционной активности рДНК в условиях облучения. На возможность такого

эффекта при воздействии ПДК радона нами указывалось ранее [33]. Заслуживающим внимания является факт положительной корреляции между числом ядрышек на клетку и частотой встречаемости остаточных ядрышек в митозе ( $r = 0,584$  ( $P < 0,001$ )). Это подтверждает предположение, что остаточные ядрышки являются одним из показателей крайней степени активации транскрипционной активности рибосомальных генов и компенсируют недостаток белков, необходимых для протекания митоза, возникающий в результате стрессового воздействия и, возможно, участвуют в поддержании механизмов checkpoint-репарации.

Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что ПДК радона 200 и 400 Бк/м³ вызывают нестохастические цитогенетические эффекты у *Zebrina pendula* (задержку прохождения клетками стадий митоза; увеличение доли остаточных ядрышек в интерфазе; рост числа многоядрышковых клеток; появление амитозоподобных фигур), которые, возможно, связаны с работой механизмов checkpoint-контроля митоза. Учитывая, что *Zebrina pendula* – более радиорезистентный объект, чем человек, у человека также можно предположить возникновение нестохастических цитогенетических эффектов в результате воздействия указанных активностей радона. Эта проблема требует тщательного научного изучения и обоснования вводимых ПДК радона для жилых и нежилых помещений; и возможно, требуется принятие решения по снижению уровня ПДК этого благородного газа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крисяк Э.М. // АНРИ. 1996. Вып. 3. С. 13 – 16.
2. Крышев И.И., Алексахин Р.М., Рябов И.Н. и др. Радиоактивное загрязнение районов АЭС. М. Ядерное общество СССР. 1990. 150 с.
3. Pershagen G., Akerblom G., Axelson O. et al. // M. Engl. Med. 1991. V. 330. № 3. P. 159 – 164.
4. Volkle H. // Umweltradioaktivitat und Strahlendosen in der Schweiz 1993. Friborg. 1994. S.A.1. – A.19.
5. Seindorf K., Luben J., Wichmann H.E. et al. // Inter. J. Epidemiol. 1995. V.24. № 3. P. 435 – 492.
6. Brydges B.A. et al. // Lancet. 1991. № 8751. P. 1187–1189.
7. Дубинин Н.П., Тарасов В.А. // Успехи современной генетики. М. 1969. С. 3 – 95.
8. Volkle H., Minder Ch.E. // Umweltradioaktivitat, Radioekologie, Strahlenwirkung. Koln. 1993. S. 933–938.
9. Иванов А.Е. Радиационный рак легкого. М. Медицина. 1990. 224 с.
10. Finkelstein M.M. // Occup. And Environ. Med. 1996. V. 53. № 10. P. 697 – 702.
11. Boice J.D., Lubin J.H. // Radiat. Res. 1996. V. 146. № 3. P. 356 – 357.
12. Jostes R.F. // Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol. 1996. V. 340. № 2 – 3. P. 125 – 139.

13. *Villeneuve P.J., Morrison H.I.* // Scand. J. Work, Environ. and Health. 1997. V. 23. № 3. P. 221 – 226.
14. *Toburen L.H.* // Lancet. 1996. № 9008. P. 1059–1060.
15. *Cohen B.L.* // Health Physics. 1993. V. 65. № 5. P. 529 – 531.
16. *Luebeck E.G., Curtis S.B., Cross F.T. et al.* // Radiat. Res. 1996. V. 145. № 2. P. 163 – 173.
17. *Macdonald C.R., Laverock M.L.* // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. 1998. V. 35. № 1. P. 109 – 120.
18. *Журавлев В.Ф.* Токсикология радиоактивных веществ. М. Энергоатомиздат. 1990. 336 с.
19. Защита от радона-222 в жилых зданиях и на рабочих местах (Публикация 65 МКРЗ): Доклад Международной комиссии по радиозоэкологической защите. М. Энергоатомиздат. 1995. 67 с.
20. *Аверкина Н.А.* // Медицина труда и промышленная экология. 1996. № 9. С. 32 – 36.
21. *Li Wei, An Shu-Qing, Wang Ren-Zhong et al.* // Nucl. Sci. and Techn. 1996. V. 7. № 4. P. 253 – 255.
22. *Papworth D.* // J. Roy. Soc. Health. 1997. V. 117. № 2. P. 75 – 80.
23. *Voice J.D.* // Radiat. Res. 1997. V. 147. № 2. P. 135–137.
24. *Peto J., Darby S.* Lung Cancer – Radon Risk Reassessed // Nature. 1994. V. 368. P.97 – 98.
25. *Кеурим-Маркус И.Б.* // Бюл. Центра обществ. Инф. по атом. энергии. 1996. № 8. С. 33 – 37.
26. *Kendall G.M., Muirhead C.R.* // J. Radiol. Prot. 1997. V. 17. № 3. P. 195 – 196.
27. *Быховский А.В.* Гигиенические вопросы при подземной разработке урановых руд. М. Медгиз. 1963. 332 с.
28. *Гуревич М.А.* Рак легкого у горнорабочих железорудных шахт: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Донецк. 1969. 20 с.
29. *Bauchinger M., Braselmann H., Kulka U. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 1996. V. 70. № 6. P. 657 – 663.
30. *Кольтовер В.К.* // Радиационная биология. Радиозэкол. 1994. Т. 34. № 2. С. 257 – 264.
31. *Gfeller W., Holliger M., Piller G. et al.* // Umwelt-radioaktivitat und Strahlendosen in der Schweiz. Fribourg. 1997. S. B.2.1. – B.2.9.
32. *Буторина А.К., Калаев В.Н., Вахтель В.М., Бабенко А.Г.* // Физика и радиоэлектроника в медицине и биотехнологии: материалы 3 международ. научно-технич. конференции. Владимир. 1998. С. 284–286.
33. *Буторина А.К., Калаев В.Н., Вахтель В.М., Бабенко А.Г.* // Инф. листок Воронежского ЦНТИ. № 155 – 98. – 1998 – 2 с.
34. *Буторина А.К., Калаев В.Н.* // Экология. 2000. № 3. С. 206 – 210.
35. *Алов И.А.* // Вестник АМН СССР. 1965. №11. С. 58 – 66.
36. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М. Высш. шк. 1990. 352 с.
37. *Кулаичев А.П.* Методы и средства анализа данных в операционной среде Windows. Stadia 6.0. М. Информатика и компьютеры. 1996. 257 с.
38. *Колтовая Н.А.* Механизм checkpoint-контроля у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Пушино: Препринт Пушино, 2001. 38 с.
39. *Калаев В.Н.* Цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды с использованием растительных тест-объектов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж. 2000. 25 с.
40. *Кузин А.М., Вагабова М.Э.* // Радиобиология. 1983. Т. 23. Вып. 5. С. 682 – 685.
41. *Пантюхина А.Г., Дергачева И.П., Петин В.Г.* // 2 съезд биофизиков России: тез. докл., 27 – 27 августа, 1999, Москва. М. 1999. Т. 3. С. 829.
42. *Петин В.Г., Жураковская Г.П., Пантюхина А.Г. и др.* // Радиационная биология. Радиозэкол. 1999. Т. 39. № 1. С. 113–126.
43. *Рассохина А.В.* // 2 съезд биофизиков России: тез. докл., 23 – 27 августа, 1999, Москва. М. 1999. Т.3. С. 840.