

**Экологическая значимость определения внеклеточной
низкомолекулярной ДНК крови при действии на организм
низкочастотного шума и ионизирующего излучения**

© 2014. В. Н. Зинкин¹, д.м.н., с.н.с., И. Н. Васильева², к.б.н., с.н.с.,
¹Научно-исследовательский испытательный центр
(авиакосмической медицины и военной эргономики) 4 ЦНИИ МО РФ,
²Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова,
e-mail: zinkin-vn@yandex.ru, nicolaivasiliev@hotmail.com

Исследована динамика содержания внеклеточной низкомолекулярной ДНК крови у экспериментальных животных после воздействия на организм ионизирующего излучения и низкочастотного шума. Нуклеиновые кислоты выделяли из плазмы крови методом фенольной депротеинизации, анализировали методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля. Обнаружено, что после облучения крыс в диапазоне доз от 2 до 100 Гр содержание внеклеточной ДНК в крови повышается. По мере нарастания дозы достоверно увеличивается уровень внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови, установлена прямая зависимость повышения содержания от дозы облучения. Высокая эффективность и надёжность полученных моделей позволяют использовать их для прогнозирования дозы облучения. Существенное повышение уровня низкомолекулярной ДНК в крови выявлено через 1 сут. после однократного акустического воздействия. Повышенный уровень содержания низкомолекулярной ДНК сохранялся спустя 7 сут. после окончания воздействия. Многократное воздействие шума приводило к ещё большему увеличению уровня исследуемого показателя в плазме крови экспериментальных животных. Увеличение содержания этого показателя при различных по своему происхождению патологиях позволяет рассматривать его в качестве неспецифического критерия, указывающего на увеличение и/или ускорение гибели клеток в организме человека и животных, а также может быть применимо в качестве биологического критерия для экологического мониторинга.

The dynamics of low-molecular-weight extracellular DNA content in blood of experimental animals after exposure to ionizing radiation and low-frequency noise is studied. Nucleic acids were isolated from blood plasma by phenol deproteinization and were analyzed by electrophoresis in gradient polyacrylamide gels. It is found that extracellular DNA content in the blood of rats is increased after irradiation in the dose range from 2 to 100 Gy. Levels of low-molecular-weight extracellular DNA of blood is significantly increased with the increasing of the dose of irradiation, a direct correlation between the content of that DNA and the radiation dose is established. High efficiency and reliability of the models allows to use them to predict the dose of irradiation. Significant increase of low-molecular-weight DNA in blood was found one day after a single acoustic impact. Elevated levels of low-molecular-weight DNA was maintained 7 days after exposure. Multiple exposure to noise can lead to the greater increase of the level of investigated indicator in blood plasma of experimental animals. The influence of both ionizing radiation and low-frequency noise led in increase of level of extracellular low-molecular-weight DNA fraction in rats' blood. Increase of the content of this index in blood at different in origin pathologies can be considered as a non-specific criterium, pointing at the increase and/or acceleration of cell death in humans and animals, and also it can be used as a biological criterium for environmental monitoring.

Ключевые слова: вредное действие, ионизирующее излучение, низкомолекулярная ДНК крови, шум, экология

Keywords: harmful action, ionizing radiation, low-molecular-weight DNA of blood plasma, noise, ecology

Введение

Важной проблемой научно-технического прогресса является ухудшение экологической обстановки, в том числе рост шумовой загрязнённости на производстве и населённых местах. Доля рабочих мест, не соответствующих гигиеническим нормативам по шуму и инфразвуку, занимает в РФ первое место среди физических факторов. Радиационная обстановка на территории России остаётся в целом

удовлетворительной. Радиационный фактор не является ведущим фактором вредного воздействия на здоровье населения. В ряде регионов особенности радиационной обстановки определяются радиоактивным загрязнением, обусловленным последствиями аварии на Чернобыльской АЭС, деятельностью ПО «Маяк» и Семипалатинского полигона [1].

Активное развитие промышленных объектов, таких, как газо- и нефтедобывающих, создание магистральных трубопроводов на суше и

в воде, строительство новых АЭС, в том числе и в прибрежных зонах, транспортной сети и др., приводит к расширению сферы влияния физических факторов на окружающую среду и создаёт угрозу дальнейшего ухудшения экологической обстановки [2–5]. Кроме того, возможность возникновения экстремальных ситуаций и аварий на промышленных объектах обуславливает высокие риски для персонала, населения и среды обитания. Определённым подтверждением этому является последняя авария на АЭС Фукусима-1 в Японии (г. Фукусима).

Несмотря на достаточно большое количество сведений о биологическом влиянии акустических колебаний (шума и инфразвука) и ионизирующего излучения (ИИ) на организм человека и животных, изучение их действия продолжает оставаться актуальной проблемой, что привлекает интерес учёных к поиску новых критериев их биологической и экологической значимости.

Работами последних лет установлено, что небольшие количества ДНК обнаруживаются и вне клеток, прежде всего, в плазме крови животных и человека [6]. Существует несколько источников появления ДНК в крови: процессы образования и созревания постклеточных структур крови (эритроциты и тромбоциты); процесс некроза или апоптоза ядродержащих клеточных элементов крови и эндотелиальных клеток; активная секреция ДНК клетками во внеклеточное пространство [7].

Интерес к изучению внеклеточной ДНК плазмы крови обусловлен прогностической и диагностической значимостью этого показателя при ряде патологических состояний, таких, как онкологические, аутоиммунные, соматические заболевания, неврологические расстройства, посттравматический синдром и др. [8]. Имеются единичные сообщения об изменении этого показателя у лабораторных крыс при действии низкочастотного шума (НЧШ) [5] и ИИ [9–13]. Показано, что эти физические факторы способны приводить к увеличению внеклеточной ДНК плазмы крови животных. Поэтому данный биологический показатель можно использовать для оценки экстремального характера внешних факторов при экологическом мониторинге окружающей среды.

Целью работы было исследовать динамику содержания внеклеточной низкомолекулярной ДНК крови у экспериментальных животных как неспецифического показателя экологически вредного воздействия на организм ИИ и НЧШ.

Методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на белых крысах-самцах массой тела 180–250 г. Для моделирования патологических состояний в качестве экстремальных факторов использовали ИИ и НЧШ. Общее однократное облучение животных проводили гамма-квантами ¹³⁷Cs на аппарате ИГУР при мощности дозы 1,9 Гр/мин. Доза облучения варьировала от 2 до 100 Гр. Забор крови проводили в сроки от 1 ч. до 7 сут. после облучения животных.

Для исследования влияния НЧШ крыс подвергали однократному (в течение 17 мин.) и многократному (13 недель по 5 дней в неделю 1 раз в день по 17 мин.) воздействию шума с уровнем звукового давления 120 и 150 дБ и максимумом спектра в области низких частот. Исследование выполнено на лабораторной установке, на которой в качестве акустического генератора использовали электродинамический излучатель «JBL 2225» (США). Забор крови осуществляли через 1 и 7 сут. после однократного и через 1 сут. после многократного действия.

Определение внеклеточной ДНК в крови проводили спектрофлуориметрическим методом, а низкомолекулярной фракции в крови – по методике [14] в модификации [10]. Плазму крови получали центрифугированием со скоростью 900 g в течение 10 мин. при +4°C. Для полного удаления форменных элементов плазму центрифугировали дважды при 2200 g. Нуклеиновые кислоты из плазмы крови выделяли методом фенольной депротеинизации. Осадки нуклеиновых кислот растворяли в деионизированной воде из расчёта 1 мкл на 1 мл плазмы крови. Полученный препарат инкубировали с РНКазой и анализировали методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (2/16%) в 0,04 М трис-ацетатном буфере (рН 7,7), содержащем 0,1 моль/л ЭДТА. Для идентификации исследуемых фракций использовали маркеры – рестрикты PBR322/BSPR1 и лямбда/Alu1, наносимые в количестве 1 мкг/мкл. Гели фотографировали в проходящем УФ и сканировали. Содержание ДНК определяли путём сравнения со стандартами.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента для несвязанных выборок. Для прогнозирования биологического эффекта от дозы облучения был использован регрессионный анализ.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований показали, что после облучения крыс в диапазоне доз от 2 до 100 Гр выявлено повышение содержания внеклеточной ДНК в крови. По мере увеличения дозы облучения содержание ДНК прогрессивно возрастало от 25,5±3,4 до 394,0±74,4 нг/мл (в контроле 26,35±1,8 нг/мл). При исследовании крови в различные сроки от 1 ч. до 7 сут. установлено, что максимальных значений концентрация ДНК достигала спустя 5 ч. после облучения. Возвращение к исходным данным в большинстве случаев наступало к концу 1 сут., за исключением группы крыс, получивших летальную дозу облучения 100 Гр [10].

Исследование состава внеклеточной ДНК показало, что почти весь прирост ДНК в плазме крови происходил за счёт низкомолекулярной фракции. При электрофоретическом разделении образца внеклеточной ДНК плазмы крови её высокомолекулярная фракция была расположена наверху геля, а исследуемая низкомолекулярная фракция в виде пятна находилась внизу. Величина фрагментов низкомолекулярной фракции составляла 160–180 п.н., что соответствует размерам мононуклеосомы. Содержание внеклеточной низкомолекулярной ДНК (вкнмДНК) в плазме крови через 5 ч. после облучения животных представлено в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что после облучения по мере нарастания дозы достоверно ($p < 0,05$) увеличивается уровень вкнмДНК в крови практически во всех группах крыс. В диапазоне от 2 до 20 Гр установлена прямо пропорциональная зависимость повышения содержания её от дозы облучения, которая описывается линейным уравнением:

$$y = -1,25 + 6,95x, \quad (1)$$

где y – количество вкнмДНК в плазме крови животных (нг/мл); x – доза облучения от 1 до 20 Гр.

При дозах облучения свыше 20 Гр зависимость приобретает более сложный логарифмический характер:

$$y = -231,29 + 125,30 \ln x, \quad (2)$$

где y – количество вкнмДНК в плазме крови животных (нг/мл); x – доза облучения от 20 до 100 Гр.

Полученные уравнения регрессии обладают высокой информативностью ($p < 0,001$) и являются эффективными, так как коэффициент детерминации $R^2 = 0,99$. Высокая эффективность и надёжность полученных моделей позволяют использовать их для прогнозирования дозы облучения животных не только в диапазоне дозы облучения от 1 до 100 Гр, но и расширить его до 25%. Появление в бесклеточной части крови вкнмДНК связывают с процессом программированной клеточной гибели [15].

Таким образом, выявленные закономерности свидетельствуют о принципиальной возможности использования количественного определения вкнмДНК в качестве биодозиметрического показателя при воздействии ионизирующего излучения. За счёт своей информативности данный метод применим к широкому диапазону доз облучения от 1 до 100 Гр.

В последующих экспериментальных исследованиях установлено, что через 1 сут. после однократного воздействия НЧШ уровень вкнмДНК существенно ($p < 0,05$) увеличился в крови обеих подопытных групп (табл. 2).

Межгруппового различия ($p > 0,05$) в содержании этого показателя в зависимости от уровня звукового давления (УЗД) не выявлено. Спустя 7 сут. после окончания действия уровень вкнмДНК остался практически на прежнем уровне достоверно ($p < 0,05$) высоком уровне в группе животных, подвергшихся воздействию НЧШ с УЗД 120 дБ, а во второй группе крыс (УЗД 150 дБ) он стал снижаться, но оставался выше ($p > 0,05$) контрольных величин. Многократное воздействие НЧШ приводило к ещё большему увеличению ($p < 0,05$) уровня этого показателя в плазме крови в обеих группах крыс. В группе животных, которые подверглись действию НЧШ при УЗД 120 дБ, содержание вкнмДНК повышалось до высоких значений 644,58 нг/мл, существенно ($p < 0,05$) выше, чем в группе крыс с УЗД 150 дБ.

Нами впервые показано, что действие высокоинтенсивного НЧШ сопровождается

Таблица 1

Содержание внеклеточной низкомолекулярной фракции ДНК в плазме крови (нг/мл) через 5 ч. после облучения животных ($M \pm m$, $n=7$)

Контрольная группа	Доза облучения в подопытной группе, Гр					
	2	4	8	20	50	100
5,5±1,5	11,9±5,7	25,5±7,5*	53,2±15,5*	138,6±28,6*	271,6±42,4*	338,5±49,9*

Примечание: * прирост содержания достоверен ($p < 0,05$)

Таблица 2

Содержание внеклеточной низкомолекулярной фракции ДНК в плазме крови (нг/мл) белых крыс после воздействия низкочастотного шума ($M \pm m$, $n=8$)

Воздействие	Время исследования после воздействия	Контрольная группа	Уровень звукового давления в подопытной группе, дБ	
			120	150
Однократное	1 сут.	11,0±5,4	84,7±30,9*	83,5±23,7* p>0,05
	7 сут.		90,3±18,8*	40,4±6,3* p<0,05
Множократное	1 сут.	17,7±1,7	644,6±89,2*	395,6±99,9* p<0,05

Примечание: 1. * отличие от контроля $p<0,05$. 2. $p<0,05$ – различие между группами достоверно.

повышением уровня вкнмДНК в крови крыс. Необходимо обратить внимание на следующее. Во-первых, при однократном акустическом воздействии концентрация исследуемого показателя существенно увеличивается, но не превышает 100 нг/мл, а выраженность реакции соответствует дозе ионизирующего излучения до 20 Гр. Во-вторых, при многократном действии НЧШ уровень вкнмДНК в крови увеличивается ещё больше, достигая 644,6±89,2 нг/мл, что практически в два раза превышает величину, полученную при дозе облучения в 100 Гр (338,5±49,9 нг/мл). В-третьих, шумовое воздействие приводит к устойчивому повышению данного показателя в плазме крови у крыс, что указывает на отсутствие адаптационных возможностей организма к данному фактору, а значит, достаточно высокую его экстремальность.

Полученные экспериментальные данные и знание некоторых механизмов действия НЧШ позволяют высказать предположение о механизмах, лежащих в основе появления вкнмДНК в крови у крыс. Известно, что острое воздействие высокоинтенсивного НЧШ сопровождается структурными и клеточными нарушениями во внутренних органах крыс, особенно в лёгких. Это проявляется появлением в лёгких субплевральных кровоизлияний, участков дистелектаза, полнокровия сосудов микроциркуляторного русла, а также увеличением дегрануляции тучных клеток и тромбоцитов, активацией и деструкцией лейкоцитов [16]. Поэтому гибель клеток, которая наблюдается при вышеописанных нарушениях в лёгких, и прямое воздействие на клетки крови можно рассматривать в качестве основной причины, приводящей к повышению уровня вкнмДНК в крови.

При многократном действии НЧШ характер морфологических нарушений несколько изменяется. На первое место выходят струк-

турные изменения, характерные для очаговой эмфиземы лёгких (межальвеолярные перегородки истончены, повышена воздушность альвеол, альвеолы округлены, входы в них расширены). Отмечалось повышенное кровенаполнение лёгких, проявляющееся полнокровием сосудов микроциркуляции с признаками разделения форменных элементов крови, краевого стояния лейкоцитов, скопления эритроцитов в виде «монетных столбиков»; имелись очаги диапедезных кровоизлияний. Эти изменения в лёгких сохранялись на протяжении длительного времени [16]. Они могут служить структурной основой для развития такой патологии, как хроническое неспецифическое заболевание лёгких по типу обструктивного бронхита и/или очаговой эмфиземы лёгких. Поэтому гибель клеток, которая наблюдается при вышеописанных нарушениях в лёгких, и изменения в клетках крови можно рассматривать в качестве причины, приводящей к повышению уровня вкнмДНК в крови. В то же время высокие уровни этого показателя после длительного воздействия шума не исключают возможности усиления апоптоза в организме.

Таким образом, уровень вкнмДНК крови можно использовать в качестве критерия действия шума на организм и экологического мониторинга.

Заключение

При патологических состояниях, сопровождающихся гибелью клеток и усилением процесса апоптоза, происходит увеличение содержания вкнмДНК [15, 17]. Повышение уровня этого показателя в крови при различных по своему происхождению патологиях позволяет рассматривать его в качестве неспецифического показателя, указывающего на увеличение и/или ускорение гибели клеток в

организме человека и животных. Полученные нами данные подтверждают возможность использования вкнмДНК как информационного показателя для диагностики и определения степени воздействия экологически неблагоприятных физических факторов (ИИ и НЧШ), особенно при экстремальных и аварийных ситуациях.

В окружающей среде НЧШ возникают во время штормов, приливов, гроз, землетрясений и вулканической деятельности. Подобные явления наблюдались на определённых стадиях геологического развития нашей планеты, сопровождаясь вымиранием отдельных таксономических групп и возникновением новых. Развитие современной цивилизации связано с появлением и развитием техногенных источников НЧШ, которые могут быть причиной сокращения ареалов обитания и численности животных [4, 18].

Влияние шумового загрязнения на фауну при многих экологически опасных видах производственной деятельности, в том числе при транспортировке и добыче углеводородного сырья в водной среде, изучено недостаточно. Во многом именно этим объясняется отсутствие федеральных экологических нормативов и стандартов допустимого акустического загрязнения окружающей среды. Между тем, снижение уровней шума и инфразвука, возникающих при эксплуатации крупных и протяжённых технологических объектов, до природных (фоновых) значений следует рассматривать как одно из важных направлений природоохранной деятельности. Вышеизложенное позволяет рассматривать акустическое загрязнение окружающей среды как новую экологическую проблему [4, 18–20].

Полученные результаты должны представлять научный и практический интерес с точки зрения экологии, а исследуемый показатель – внеклеточная низкомолекулярная фракция ДНК – можно использовать в качестве биологического критерия для экологического мониторинга ряда физических факторов. Патологии, вызванные воздействием НЧШ, сопровождаются увеличением содержания вкнмДНК крови крыс, которое, возможно, не только маркирует исследуемые воздействия ионизирующего излучения и НЧШ. Внеклеточная ДНК способна переносить генетический материал между клетками и популяциями клеток, участвуя в иммунном ответе или трансформируя клетки. В настоящее время дискутируется эволюционная роль вкнмДНК [21].

Литература

1. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2010. 456 с.
2. Зинкин В.Н., Солдатов С.К., Богомолов А.В., Кукушкин Ю.А., Ахметзянов И.М., Шешегов П.М. Авиационный шум как фактор эколого-социального неблагополучия // Проблемы безопасности полётов. 2010. № 9. С. 3–13.
3. Зинкин В.Н., Богомолов А.В., Ахметзянов И.М., Шешегов П.М. Экологические аспекты безопасности жизнедеятельности населения, подвергающегося воздействию авиационного шума // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 3. С. 97–101.
4. Пыстина Н.Б., Терехов А.Л., Зинкин В.Н., Драган С.П. Шум и инфразвук – вредные производственные факторы на предприятиях газовой промышленности // Газовая промышленность. 2012. № 1. С. 68–71.
5. Зинкин В.Н., Богомолов А.В., Кукушкин Ю.А., Солдатов С.К. Медико-социальные аспекты экологической безопасности населения, подвергающегося кумулятивному действию авиационного шума // Экология промышленного производства. 2012. № 2. С. 9–14.
6. Ковалева Ю.А., Хасанов А.А., Синтатуллина Л.М. Определение внеклеточной ДНК крови – клиническое и диагностическое значение // <http://mfvt.ru/opredelenie-vnekletochnyx-dnk-krovi--klinicheskoe-i-diagnosticheskoe-znachenie>.
7. Пономарёва А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. и др. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака лёгкого // Молекулярная биология. 2011. № 2. С. 203–217.
8. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике // Молекулярная биология. 2008. Т. 42, № 1. С. 12–23.
9. Frenzili G., Lenzi P., Scarcelli V. et al. Effect of loud noise exposure on DNA integrity in rat adrenal gland // Environ. Health Perspect. 2004. V. 112. № 17. P. 1671–1672.
10. Владимирова В.Г., Белохвостов А.С., Шерлина С.С. и др. Содержание внеклеточной ДНК в крови облученных животных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992. № 2. С. 188–191.
11. Васильева И.Н., Зинкин В.Н. Влияние вредных физических факторов на содержание низкомолекулярной ДНК плазмы крови // Донозоология и здоровый образ жизни. 2011. № 2 (9). С. 43–48.
12. Зинкин В.Н., Васильева И.Н., Вознюк И.А. Определение внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови как диагностический метод для клинических и экспериментальных исследований // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2011. Т. 45, № 5. С. 47–51.
13. Vasilyeva I.N., Zinkln V.N. The Value of Blood Plasma Low-Molecular-Weight DNA for Diagnostics of

Pathological Processes of Different Genesis // Biomedical Chemistry. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B. 2012. V. 6. № 3. P. 278–287.

14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

15. McConkey D.J., Zhivotovsky B., Orrenius S. Apoptosis-molecular mechanisms and biomedical implication. // Molec. Aspects. Med. 1996. V. 17. № 1. P. 1–110.

16. Зинкин В.Н., Свидовый В.И., Палишкина Е.Е. Неблагоприятное влияние низкочастотного шума на органы дыхания // Профилактическая и клиническая медицина. 2011. № 3. С. 280–284.

17. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Sci. 1995. V. 267, № 5203. P. 1456–1462.

18. Зинкин В.Н., Ахметзянов И.М., Орихан М.М. Инфразвук как вредный производственный фактор // Безопасность жизнедеятельности. 2013. № 9. С. 2–9.

19. Зинкин В.Н., Богомолов А.В., Драган С.П., Ахметзянов И.М. Кумулятивные медико-экологические эффекты сочетанного действия шума и инфразвука // Экология и промышленность России. 2012. № 3. С. 46–49.

20. Солдатов С.К., Зинкин В.Н., Богомолов А.В., Кукушкин Ю.А. Человек и авиационный шум // Безопасность жизнедеятельности. 2012. № 9. Приложение. 24 с.

21. Васильева И.Н., Беспалов В.Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей нервной системы и других локализаций и ее применение в онкологии // Медлайн-экспресс. 2013. № 2 (212) С. 50–57.

Правительство Кировской области
Администрация города Кирова
Вятский государственный гуманитарный университет
Институт биологии Коми Научного центра УрО РАН
МБУ «Центр Инноваций»

**ХII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием
«Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем»**
Вятский государственный гуманитарный университет
2-3 декабря 2014 г., г. Киров

Основные направления конференции:

1. Инновационные технологии в экологии
2. Биологический мониторинг природных сред и объектов
3. Методы биодиагностики в оценке качества окружающей среды
4. Геоинформационные системы и космические технологии в оценке состояния окружающей среды
5. Мониторинг в условиях техногенного загрязнения
6. Экология организмов и механизмы их адаптации к среде обитания
7. Региональные аспекты развития экологической культуры, образования и просвещения
8. Экология сред обитания и здоровья населения

Контактные адреса и телефоны:

610002, г. Киров, ул. Красноармейская, 26, Лаборатория биомониторинга
Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ,
телефон/факс (8332) 37-02-77, e-mail: ecolab2@gmail.com; ecolab@vshu.kirov.ru
Ответственный секретарь оргкомитета: Огородникова Светлана Юрьевна.
Технический секретарь оргкомитета: Кардакова Евгения Михайловна.