

На правах рукописи

Кузьмина Нина Станиславовна

**ИЗУЧЕНИЕ ОТДАЛЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ОБЛУЧЕННЫХ
ЛИЦ И ИХ ПОТОМКОВ**

Специальность 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва 2021

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный консультант: доктор биологических наук,
РУБАНОВИЧ Александр Владимирович,
заведующий лабораторией экологической генетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей генетики им.
Н.И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
ДРУЖИНИН Владимир Геннадьевич,
заведующий кафедрой генетики
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
"Кемеровский государственный университет", г. Кемерово

доктор биологических наук,
НУГИС Владимир Юрьевич,
заведующий лабораторией радиационной гематологии
и цитогенетики Федерального государственного
бюджетного учреждения «Государственный научный
центр Российской Федерации – Федеральный
медицинский биофизический центр имени
А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического
Агентства, г. Москва

доктор биологических наук, профессор,
ГЕРАСЬКИН Станислав Алексеевич,
заведующий лабораторией радиобиологии и
экотоксикологии сельскохозяйственных растений
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский
научно-исследовательский институт радиологии и
агроэкологии», г. Обнинск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"

Защита состоится « __ » _____ в __ часов на заседании диссертационного совета
Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина
3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института
www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан « __ » _____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н.

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Интенсивное развитие атомной промышленности, ядерной медицины и науки приводит к росту количества людей, подвергающихся воздействию радиационного фактора.

С учетом данных мировой литературы, абсолютно очевидно, что реальная оценка генетического риска (риск для потомства, то есть не соматические эффекты) включает не только анализ гаметических (генных/хромосомных) мутаций, но и таких отдаленных эффектов радиации как трансгенерационная передача нестабильности генома от облученных родителей к их необлученным потомкам (Morgan W.F., 2003; Воробцова И.Е., 2006; Aghajanyan A., Suskov I., 2009; Пилинская М.А. и др., 2011; Fucic A. et al., 2016; Соснина С.Ф., Сокольников М.Э., 2019; Dubrova Yu., 2019). Результаты эпидемиологических исследований различных когорт облученных лиц не продемонстрировали явные прямые доказательства влияния радиационного воздействия на наследственность человека (наследственные болезни, врожденные пороки, спонтанные аборт, мертворождения) (ICRP, 2007; UNSCEAR, 2010; Little M.P., 2015; Соснина С.Ф., Сокольников М.Э., 2019; Котеров А.Н., Бирюков А.П., 2012).

Можно сказать, что единственными критериями, по которым активно оцениваются генетические эффекты радиационного воздействия в потомстве облученных индивидов, а результаты воспроизводятся при обследовании различных популяций экспонированных лиц, являются частоты мутаций в таких некодирующих участках генома как мини- и микросателлитные локусы. Это обусловлено уникальными свойствами этого вида последовательностей ДНК – селективной нейтральностью, высокой частотой tandemных повторов в сочетании с их большой вариабельностью (Jeffreys A.J. et al., 1988; Yauk C. L., 2004; Vergnaud G., Denoeud F., 2000; Bouffler S.D., 2006; Dubrova Yu.E., 2003, 2016, 2019; Tsyusko O. et al., 2007, 2011; Costa E.O.A. et al., 2018; и др.).

Статистически значимо повышенные частоты минисателлитных мутаций выявлены только у индивидов, подвергшихся хроническому радиационному воздействию (Dubrova Y.E. et al., 1996, 1997, 2002, 2006; UNSCEAR, 2001; Аклеев, 2007; Dubrova Y.E., 2006, 2016, 2019). Несомненно, требуются дальнейшие исследования для выяснения зависимости индукции мини-/микросателлитных мутаций в гаметах облученных лиц от вида воздействующей радиации. Трансгенерационные эффекты нестабильности генома у потомков облученных родителей продемонстрированы также по цитогенетическим показателям (абберации хромосом, микроядра) (Воробцова И.Е., 2006; Aghajanyan A., Suskov I., 2009; Пилинская М.А. и др., 2011; Fucic A. et al., 2016; Соснина С.Ф., Сокольников М.Э., 2019).

В целом, в популяционных исследованиях имеет место проблема неоднозначности оценки радиационно-индуцированных повреждений генома в соматических клетках человека в отдаленный период после облучения и трансгенерационных эффектов у потомков облученных родителей. Это связано с разным характером радиационного воздействия (вид радиации, доза, мощность дозы), промежутком времени между экспонированием и обследованием,

информативностью изучаемых показателей, репрезентативностью выборок и адекватностью контрольных когорт. В первую очередь, речь идет о генотоксических эффектах, индуцированных радиацией в малых дозах. Помимо всего, крайне малочисленны исследования, посвященные изучению мутагенных эффектов облучения в зависимости от стадии онтогенеза, на которую пришлось воздействие радиационного фактора. Между тем, очевидно, что по сравнению с взрослыми, дети являются более чувствительными к воздействию генотоксикантов окружающей среды, в том числе и радиации (Алексахин Р.М., 2014).

Как известно, выделяемые педиатрами периоды детского возраста (внутриутробный период, периоды новорожденности, грудного возраста и т.д.), характеризующиеся различными темпами роста, особенностями морфофункционального развития тех или иных органов и систем организма (Сергеева, 2007), определяют критические периоды адаптации человека к условиям окружающей среды, в том числе к воздействию генотоксикантов в малых дозах и концентрациях. Авария на ЧАЭС (Чернобыльская атомная электростанция) в 1986 году явилась трагедией, которая привела к облучению огромных контингентов населения, хотя предоставила уникальную возможность для одновременного изучения отдаленных последствий действия радиации, как правило, в малых дозах, на организм человека в наиболее уязвимые периоды его онтогенеза.

Эпидемиологические исследования выявили повышенную заболеваемость соматического характера, хронизацию болезней, учащение случаев развития иммунодефицитных состояний, анемизации, злокачественных новообразований у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному/фракционированному облучению в малых/средних дозах, и в первую очередь это касается наиболее радиочувствительного детского организма (Иванов В.К. и др., 2017, 2018, 2019; Чекин С.Ю. и др., 2017; Ivanov V.K. et al., 2017; Кашеев В.В. и др., 2015; Kashcheev V.V. et al., 2016; Балева Л.С. и др., 2003, 2015, 2019; Коренев Н.М. и др., 2012; Сипягина А.Е. и др., 2018).

Поэтому, еще одной задачей изучения отдаленных эффектов радиационного воздействия является поиск маркеров перенесенного облучения, которые могут дать интегральную оценку состояния здоровья индивида. Учитывая постулированное в радиобиологии ускоренное старение, индуцированное радиацией (Виленчик М.М., 1987), все выше упомянутые контингенты облученных лиц относятся к группе риска по преждевременной манифестации возраст-ассоциированных заболеваний (Tong J., Hei T.K., 2020). Однако, разработка системы превентивной диагностики этих патологий имеет ряд сложностей. Во-первых, сами по себе результаты широкогеномных исследований (GWAS – Genome Wide Association Studies), а, именно, анализ совокупности аллельных вариантов для множества «топовых» SNP-единичных нуклеотидных замен, проявивших каждый в отдельности связь с риском развития той или иной патологии, к сожалению, объясняет, как правило, менее 10% наблюдаемой наследуемости ряда мультифакториальных заболеваний, в том числе ассоциированных с возрастом (злокачественные новообразования, сахарный

диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания и др.) (Manolio T.A. et al., 2009; Visscher P.M. et al., 2012). Во-вторых, хотя однозначно ясно, что повреждения генома, регистрируемые в виде аббераций хромосом, генных мутаций, разрывов ДНК в отдаленный период после облучения организма человека, а также у его потомков, не могут не сказаться на функции клетки и организма в целом, отсутствуют явные доказательства их связи с индукцией тех или иных возрастных патологий (Сусков И.И. и др., 2006; Михайлова Г.Ф., 2007; Нугис В.Ю., Козлова М.Г., 2017). В то же время, последние достижения в области эпигенетики старения и возраст-ассоциированных заболеваний, связанные с разработкой высокозначимой модели оценки биологического возраста индивида (Horvath S., 2013; Hannum G. et al., 2013; Marioni R.E. et al., 2015; Soriano-Tárraga K. et al., 2016; Zampieri M. et al., 2015), позволяющей выявлять лиц с преждевременным старением, дают надежду на решение выше изложенной проблемы. Поэтому, изучение закономерностей индукции эпигенетических изменений в организме, подвергшемся радиационному воздействию, является еще одним важным и актуальным аспектом оценки отдаленных последствий облучения (Кузьмина, 2020).

Степень разработанности темы. К настоящему моменту накопилось достаточное количество сведений о существенно повышенных уровнях отдаленных генетических нарушений (абберации хромосом, микроядра, генные мутации, разрывы ДНК) в соматических клетках детей и взрослых, подвергшихся хроническому/фракционированному облучению в малых/средних дозах, в частности, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС (ликвидаторы аварии на ЧАЭС и жители территорий с радионуклидными загрязнениями) (Шевченко В.А., Снигирева Г.П., 2006; Снигирева Г.П. и др., 2011; Воробцова И.Е., Семенов А.В., 2006; Севаньяев А.В. и др., 2005; 2006; Кузьмина Н.С., 2003; Михайлова Г.Ф., 2007; и др.). При использовании цитогенетических методов получены доказательства трансгенерационной нестабильности генома, имеющей место у детей ликвидаторов аварии на ЧАЭС (Степанова Е.И. и др., 2004; Воробцова И.Е., 2006; Aghajanyan A., Suskov I., 2009; Пилинская М.А. и др., 2011). Статистически значимое увеличение частоты минисателлитных мутаций выявлено в хронически облучаемых популяциях, населяющих территории с неблагоприятной радиационной обстановкой (Аклеев, 2007; Dubrova Y.E., 2006, 2016, 2019). Экспериментальные исследования на лабораторных животных (in vivo) показали дозозависимую индукцию гиперметилирования промоторов генов, которое могло сохраняться на протяжении длительного периода времени (до нескольких месяцев) (Wang J. et al., 2014; Lima F. et al., 2014; Nzabarushimana E. et al., 2014; Impey S. et al., 2016, 2017).

Однако, большая часть исследований по оценке генотоксических эффектов низкоинтенсивной радиации у детей и подростков выполнены в первые 10-15 лет после Чернобыльской катастрофы, а значит посвящены изучению последствий их внутриутробного и постнатального облучения (Севаньяев А.В. и др., 2005; Михайлова Г.Ф., 2007; Степанова Е.И. и др., 2007; и др.). Сравнительный анализ генетических эффектов, выявленных у детей и взрослых, непосредственно облученных во время аварии и продолжающих проживать в условиях

низкоинтенсивного воздействия радиации, с таковыми показателями у детей, родившихся спустя годы и десятилетия после Чернобыльской катастрофы, но являющихся потомками родителей, облученных в критические периоды детства, не проводился. Отсутствуют работы по многопараметровой оценке генетических нарушений в семьях индивидов (два поколения: родители и их дети), подвергшихся радиационному воздействию. Между тем эти сведения необходимы для выявления трансгенерационной геномной нестабильности, индуцируемой низкоинтенсивным воздействием радиации в малых дозах, а также выяснения особенностей проявления этого феномена, отличающих его от генетических эффектов, которые индуцируются в организме, подвергшемся непосредственному облучению. Отсутствуют также работы по изучению мутаций мини-/микросателлитных локусов ДНК в таких уникальных когортах лиц как потомки профессионалов-атомщиков, подвергшихся хроническому воздействию β - излучения трития и его окиси, характеризующегося высокой плотностью ионизации тканей. Исследования радиационно-индуцированного гиперметилирования промоторов генов в нормальных лейкоцитах человека в отдаленный период после облучения не проводились. Решение всех этих вопросов, охватывающих несколько направлений исследований, в совокупности необходимо для разработки системы отдаленных маркеров облучения, имеющих очевидную прогностическую ценность в отношении здоровья облученного индивида и его потомков.

Цель и задачи исследования. В свете вышесказанного цель данной работы заключалась в комплексном изучении генетических и эпигенетических нарушений в лимфоцитах человека в отдаленный период после радиационного воздействия, а также в оценке аналогичных показателей у потомков облученных лиц.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести изучение цитогенетических эффектов в двух поколениях лиц - жителей территорий, загрязненных радионуклидами в результате аварии на ЧАЭС. Проанализировать показатели мутагенеза у детей в зависимости от стадии онтогенетического развития их родителей на момент облучения.
2. Провести изучение по цитогенетическим и иммуногенетическим критериям состояния генома лимфоцитов у отцов-ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС и их необлученных детей. Оценить сопряженность между изученными показателями в обоих поколениях лиц.
3. Провести изучение частоты мутаций в мини- и микросателлитных локусах у детей профессионалов-атомщиков, подвергавшихся хроническому воздействию β - излучения трития и его окиси.
4. Провести изучение гиперметилирования CpG - островков промоторов генов, участвующих в основных защитных функциях клетки, у облученных лиц вышечисленных групп (ликвидаторы аварии на ЧАЭС, жители территорий с радионуклидными загрязнениями, профессионалы-атомщики г. Сарова), а также у их потомков.

5. Провести верификацию полученных эпигенетических данных на независимой выборке работников предприятия атомной промышленности ПО «Маяк» (г. Озерск) с рассчитанными дозами облучения с расширением спектра анализируемых генов.
6. Провести анализ дозовой зависимости индукции гиперметилирования генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся облучению в результате профессиональной деятельности.
7. Провести анализ сопряженности между цитогенетическими и эпигенетическими показателями. Сравнить их прогностическую значимость как биомаркеров отдаленного радиационного воздействия.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа является научным исследованием, в котором решается важная и актуальная проблема – многопараметровая оценка отдаленных генотоксических эффектов у лиц, подвергшихся радиационному воздействию на разных этапах онтогенеза, в том числе в критические периоды детства, трансгенерационного феномена дестабилизации генома у их потомков и анализ закономерностей индукции гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов основных защитных систем клетки, выявляемого в лимфоцитах крови человека спустя годы и десятилетия после перенесенного облучения.

Объектом исследования являлись различные контингенты лиц, подвергшихся радиационному воздействию: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, жители территорий с радионуклидными загрязнениями после Чернобыльской катастрофы, работники предприятий атомной промышленности (реакторный и радиохимический заводы ПО «Маяк» г. Озерска, Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики – РФЯЦ-ВНИИЭФ г. Сарова), а также их облученные и необлученные дети. В целом, обследованные лица подверглись хроническому или фракционированному облучению в широком диапазоне доз.

Предметом исследования являлись цитогенетические показатели (абerrации хромосом в лимфоцитах периферической крови), лимфоциты, мутантные по локусу Т-клеточного рецептора (TCR – мутации), лимфоциты с иммунофенотипом CD95⁺, экспрессирующие на поверхности мембраны FAS/APO1 – маркер апоптоза, мутации в мини-/микросателлитных локусах, метилированные CpG-динуклеотиды CpG-островков промоторов ряда генов. Кроме того, сюда относятся факторы радиационной (доза, мощность дозы, вид ионизирующего излучения) и нерадиационной природы (стадия онтогенеза, на которую пришлось радиационное воздействие, промежуток времени между облучением и взятием образцов крови, промежуток времени между окончанием работы в условиях радиационного воздействия и зачатием детей), влияющие на выраженность геномных/эпигеномных нарушений у облученных лиц и их потомков.

Гипотеза исследования: в облученном организме в отдаленный период после перенесенного воздействия наблюдается широкий спектр генетических/эпигенетических нарушений, а также имеет место сопряженность между исследованными показателями. У части обследованных потомков облученных лиц, в том числе подвергшихся низкоинтенсивному облучению в

критические периоды детства, выявляется трансгенерационная нестабильность генома, которая характеризуется разнообразием проявлений, не коррелирующих друг с другом. Наблюдаемые нарушения не только являются отдаленными маркерами перенесенного облучения, но и сопряжены с риском развития соматической заболеваемости у облученных лиц и их потомков.

Для решения поставленных задач применялись цитогенетический и молекулярно-генетические методы исследований, иммунофенотипирование лимфоцитов крови (проточная цитофлуориметрия), а также общепринятые теоретические методы научного познания.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена применением современных, соответствующих поставленным задачам экспериментальных подходов и охватом репрезентативных выборок обследуемых лиц, критическим анализом мировой литературы, а также использованием адекватных статистических методов обработки данных. Все сформулированные в диссертации положения, выводы, рекомендации полностью базируются на результатах проведенных исследований.

Материалы диссертационной работы представлены на научно-практической конференции «Парадигмы современной радиобиологии» (Украина, Киев - Чернобыль, 2004), VI Международной конференции «Экология человека и природа» (Москва-Плес, 2004), ежегодных конференциях, посвященных Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки-медицине» (Москва, 2004, 2005, 2006, 2007), III Международной конференции «Генетические последствия чрезвычайных и радиационных ситуаций» (Дубна, 2005), Second International Conference dedicated to the 105th anniversary of the birth of N.W.Timofeeff-Ressovsky “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” (Armenia, Yerevan, 2005), III Международном симпозиуме «Хроническое радиационное воздействие: медико-биологические эффекты» (Челябинск, 2005), Международной конференции «Современные проблемы генетики» (Белоруссия, Минск, 2005), V съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2006), International Congress “Chernobyl – 20 Years Later” (Germany, Berlin, 2006), 35th Annual Meeting of European Radiation Research Society (Ukraine, Kiev, 2006), Российском конгрессе “Современные технологии в педиатрии и детской хирургии” (Москва, 2006, 2009), II Международной конференции «Человек и электромагнитные поля» (Саров, 2007), конференции «Динамика генофондов» (Москва, 2007), V Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009), Third International Conference dedicated to N.W.Timofeeff-Ressovsky “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” (Alushta, 2010), VI Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2010), конференции «Генофонды и генетическое разнообразие» (Москва, 2010), Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (Serbia, Nis, 2014), VII Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2014), «Seminar of Ecology - 2015» (Sofia, 2015), Fourth International Conference, dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology, and evolution» (St. Peterburg, 2015), Российской конференции с международным

участием «Современные направления в радиобиологии и астробиологии. Молекулярные, генетические, клеточные и тканевые эффекты» (Дубна, 2015), Российской конференции с международным участием "Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений" (Дубна, 2016), Российской конференции с международным участием «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019), на заседаниях Ученого совета ИОГен РАН (Москва, 2015, 2019), межлабораторном семинаре ИОГен РАН (Москва, 2021).

Личный вклад автора. Основные результаты работы получены лично автором, либо при осуществлении его ведущей роли в коллективных исследованиях (планирование проведения всех разделов экспериментальной работы, личное участие в них, анализ и обсуждение результатов, написание статей). Иммуногенетические исследования (анализ TCR-мутантных лимфоцитов и CD95⁺ - лимфоцитов), основанные на использовании проточной цитофлуориметрии, выполнены совместно с лабораторией иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова (зав. лаб. д.м.н., профессор Сускова В.С.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Два поколения обследованных лиц – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями после аварии на ЧАЭС (135–688 кБк/м²) характеризуются повышенным уровнем соматического мутагенеза. Средние частоты aberrаций хромосом у детей, родившихся спустя десятилетия после начала воздействия радиационного фактора на их родителей в критические периоды детства, не отличаются значительно от таковых у детей, непосредственно облученных во время аварии (постнатальный/антенатальный период) и продолжающих проживать (10–15 лет до обследования) в условиях низкоинтенсивного действия радиации (средние эффективные дозы у детей двух групп: ~4–6 мЗв и ~30–35 мЗв, соответственно).

2. Результаты оценки сопряженности между изученными показателями (aberrации хромосом, TCR – мутации, CD95⁺-предикторы апоптоза), средние частоты которых существенно повышены как у облученных отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС (35 – 480 мЗв), так и у их необлученных детей, свидетельствуют об отличительных особенностях, характерных для индукции трансгенерационной геномной нестабильности в необлученном детском организме и ее индивидуальном характере.

3. Повышенная частота микросателлитных мутаций у детей профессионалов-атомщиков, подвергшихся воздействию трития и его окиси (11–994 мЗв), свидетельствует о генотоксических последствиях хронического действия β-излучения этого радионуклида на клетки генеративной системы организма.

4. Показана реальность гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов основных защитных систем клетки, выявляемого в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия (дозы от 35 до 2000 мЗв и более)

и имеющего дозозависимый характер. Продемонстрированы дифференциальные эффекты возраста и облучения в метилировании разных локусов.

5. В целом, выявлен системный характер генетических/эпигенетических нарушений, сопряженность между изученными показателями в клетках организма в отдаленный период после облучения и разнообразие спектра трансгенерационных эффектов у детей – потомков родителей, подвергшихся радиационному воздействию на разных этапах онтогенеза, в том числе в критические периоды детства.

Научная новизна полученных результатов.

Впервые проведено изучение цитогенетических эффектов в двух поколениях лиц - жителей территорий, загрязненных радионуклидами в результате аварии на ЧАЭС (135 – 688 кБк/м²), что позволило оценить последствия радиационного воздействия в малых дозах не только у индивидов, подвергшихся облучению в критические периоды детства, но и у их детей.

Впервые проведено комплексное изучение по цитогенетическим и иммуногенетическим критериям состояния генома лимфоцитов у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС и их детей, и выявлены отличительные особенности, характерные для индукции геномной нестабильности в организме необлученных потомков, по сравнению с отцами, перенесшими непосредственное радиационное воздействие.

Впервые проведено изучение уровня полиморфизма 5 мини- и 11 микросателлитных локусов у детей профессионалов-атомщиков г. Сарова (сотрудники РФЯЦ-ВНИИЭФ) – уникальной группы людей, начавших работать 40 – 50 лет назад с тритием и его окисью, радиобиологические особенности действия которого на организм человека окончательно не изучены. У потомков облученных родителей выявлена тенденция к повышенной частоте микросателлитных мутаций по сравнению с контролем.

Впервые на двух независимых выборках облученных лиц в отдаленный период после радиационного воздействия проведено изучение гиперметилирования CpG-островков промоторов генов основных защитных систем клетки и закономерностей его индукции в нормальных лейкоцитах крови (новый аспект генотоксического действия радиации).

В целом, впервые в отдаленный период после пролонгированного облучения (как правило, в малых и средних дозах) предпринят комплексный подход к оценке состояния генома/эпигенома клеток организма человека и его потомков.

Теоретическая значимость работы. В результате впервые предпринятого комплексного подхода к оценке состояния генома/эпигенома в клетках организма человека спустя годы и десятилетия после перенесенного радиационного воздействия в малых и средних дозах, а также у его потомков, выявлен системный характер генетических/эпигенетических нарушений, сопряженность между теми или иными изученными показателями и особенности проявлений трансгенерационных эффектов у детей облученных родителей. Впервые проведенное изучение гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов основных защитных систем клетки у облученных лиц двух независимых выборок показало существенную выраженность этих эпигенетических

модификаций, имеющую дозозависимый характер, в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. Генотоксические эффекты хронического воздействия β -излучения трития и его окиси на клетки генеративной системы организма, впервые выявленные по оценке уровня микросателлитных мутаций у детей профессионалов-атомщиков, существенно пополняют знания о радиобиологических эффектах действия этого радионуклида. В конечном итоге, совокупность результатов, полученных в ходе выполнения работы, существенно расширяет представления о риске пролонгированного облучения в широком диапазоне доз для настоящих и будущих поколений (генетические и соматические эффекты). Это входит в перечень основных проблем, которые ставит перед собой фундаментальная радиационная генетика и радиобиология человека.

Практическая значимость работы. Полученные результаты указывают на необходимость включения комплексной оценки состояния генома с учетом таких эпигенетических показателей, как гиперметилирование CpG - островков промоторов генов, участвующих в основных защитных функциях клетки, в систему регулярного мониторинга состояния здоровья индивидов, подвергшихся облучению в широком диапазоне доз (ликвидаторы радиационных катастроф, жители территорий с радионуклидными загрязнениями, работники атомной индустрии и др.). Это даст возможность своевременного выявления лиц, имеющих повышенный риск развития радиационно-индуцированной патологии, предшествующей регистрации морфофункциональных изменений органов и систем организма с помощью клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования. Кроме того, особой категорией наблюдения являются потомки родителей, подвергшихся облучению в различные стадии онтогенеза, в том числе в критические периоды детства, независимо от интервала времени между окончанием действия радиационного фактора и зачатием детей.

Расширение спектра исследуемых генов даст возможность создать панель высокопрогностических превентивных эпигенетических маркеров, являющихся, с одной стороны, молекулярными предикторами перенесенного в прошлом радиационного воздействия, а с другой - сопряжено с преждевременным старением и риском развития возраст-ассоциированной патологии. Биологический возраст – показатель, обладающий очевидной прогностической ценностью. Предполагается, что выявление предикторов преждевременного старения и развития тех или иных заболеваний в лейкоцитах крови облученных индивидов и их потомков – важный диагностический критерий ухудшения здоровья, что должно учитываться при индивидуализации радиационных нагрузок и разработки системы лечебно-профилактических мероприятий в рассматриваемых контингентах лиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 68 печатных работ: 23 статьи в рецензируемых журналах (входят в перечень ВАК и/или БД РИНЦ, Scopus, Web of Science), 11 публикаций являются главами книг и монографий и статьями в сборниках трудов конференций, а также 35 тезисов докладов, представленных на российских и международных съездах, конференциях, симпозиумах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 385 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения, выводов, приложения. Работа содержит 35 таблиц и 41 рисунок, включая 2 таблицы и 1 рисунок в приложении. В диссертации приведены ссылки на 589 литературных источников, из них в отечественных изданиях – 169 публикаций, в зарубежных – 420 публикаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных групп лиц. Проведено комплексное изучение отдаленных генетических и эпигенетических нарушений у лиц, подвергшихся облучению в различных радиационных ситуациях, а также у их облученных и необлученных детей. Основные контингенты обследованных лиц и проанализированные показатели представлены на рис. 1.

Проведено **цитогенетическое обследование** двух поколений лиц (дети и их родители), подвергшихся облучению в различные стадии онтогенеза, и являющихся жителями территорий, загрязненных радионуклидами после аварии на ЧАЭС (г. Новозыбков и Новозыбковский район Брянской обл., 135–688 кБк/м² по ¹³⁷Cs). Цитогенетические показатели детей, облученных во время аварии на ЧАЭС в антенатальный или постнатальный период онтогенеза и продолжающих проживать в условиях пролонгированного облучения в малых дозах, были использованы для сравнения с таковыми детей – потомков облученных родителей, то есть родившихся после аварии в 1987 – 2007 гг. и характеризующихся существенно меньшими дозами облучения (табл. 1).

Для обследования дети поступали в Федеральный детский научно-практический центр противорадиационной защиты ОСП «Научно-исследовательского клинического института педиатрии» ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (руководитель центра – проф. Л.С. Балева). Как жители территорий с неблагоприятной радиационной обстановкой, так и дети из «чистых» регионов (контрольная группа) имели различные отклонения в состоянии здоровья, среди которых преобладали астено-невротические расстройства и вегето-сосудистая дистония, заболевания органов дыхания и гастроэнтерологическая патология. Также встречались гипертензионно-гидроцефальный синдром, энцефалопатия, болезни органов мочевого выделения (циститы, пиелонефриты и др.) и эндокринной системы (в основном тиреоидная патология).

Согласно данным Санкт-Петербургского научно-исследовательского института радиационной гигиены имени профессора П.В. Рамзаева (Балонов М.И. и др., 1993; Методические указания МУ 2.6.1.2003-05, 2005; Брук Г.Я. и др., 2017), для всех вышеуказанных групп детей и их родителей были рассчитаны приблизительные средние эффективные дозы облучения от долгоживущих радионуклидов (внешнее + внутреннее облучение), накопленные к моменту обследования, которые находились в диапазоне 4 – 40 мЗв (табл. 1).

Кроме того, изучены цитогенетические показатели у 79 детей (2 – 15 лет), рожденных от ликвидаторов аварии на ЧАЭС в 1987-2006 гг., но проживающих на «чистых» территориях. Зарегистрированные дозы облучения у ликвидаторов (если такие сведения имелись) находились в диапазоне от 50 до 460 мЗв (средняя эффективная доза составляла 226 мЗв). Сроки работ в зоне ликвидации варьировали от 2 недель до 6 месяцев. Средний возраст отцов на момент аварии

составлял $28 \pm 1,5$ года. Промежуток времени между облучением отцов и зачатием детей варьировал от одного месяца до 18 лет. Проведено цитогенетическое обследование 31 полной семьи ликвидаторов аварии на ЧАЭС (отцы-ликвидаторы – 31 чел., их необлученные жены – 31 чел., дети – 39 чел.). Родители (облученные отцы и необлученные матери) поступили в Федеральный детский научно-практический центр противорадиационной защиты с целью обследования своих детей (табл. 1).

Структура заболеваемости этих детей была примерно аналогична таковой у жителей территорий с радионуклидными загрязнениями, за исключением отсутствия тиреоидной патологии у необлученных детей – потомков облученных отцов. Злокачественные новообразования у всех обследованных отцов-ликвидаторов отсутствовали. Спектр другой мультифакториальной заболеваемости у взрослых лиц контрольной группы и ликвидаторов аварии на ЧАЭС (если не учитывать степень их тяжести) был, в основном, представлен распространенными патологиями: функциональными нервными расстройствами, сердечно-сосудистыми заболеваниями, обструктивными заболеваниями органов дыхания, хроническими гастродуоденитами, язвенной болезнью желудка и др.

Кроме того, у 34 детей и 17 отцов-ликвидаторов проведено изучение **генных мутаций** по локусу Т-клеточного рецептора и **готовности клеток к апоптозу**. Проведено изучение уровня полиморфизма 5 минисателлитных (МНС) и 11 микросателлитных (МКС) локусов у детей профессионалов-атомщиков г. Сарова – сотрудников Российского федерального ядерного центра – Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной физики (РФЯЦ-ВНИИЭФ), начавших работать с тритием и его окисью 40 - 50 лет



Рис.1. Основные контингенты обследованных лиц и проанализированные показатели.

Таблица 1. Характеристика обследованных групп лиц, пострадавших в результате Чернобыльской катастрофы (оценка цитогенетических показателей).

Дети (средняя эффективная доза облучения)				Родители (средняя эффективная доза облучения)			
N	На момент аварии		Возраст на момент обследования	N	На момент аварии		Возраст на момент обследования
	Возраст	Стадия онтогенеза			Возраст	Стадия онтогенеза	
Дети и родители – жители территорий с радионуклидными загрязнениями (г. Новозыбков и Новозыбковский р-н Брянской обл., 135 – 688 кБк/м ²) 200 чел.							
Дети 1982 – н. 1986 г.р. (~ 30 – 35 мЗв)				Родители (~ 30 – 40 мЗв)			
32	0,3 – 4 г.	постнатальная	11 – 17 лет				
Дети 1986 г.р. (~ 30 – 35 мЗв)							
15	12 – 37 неделя гестации	внутриутробная	10 – 17 лет				
Дети 1987 – 2007 г.р. – потомки облученных родителей (~ 4 – 20 мЗв)			2 – 14 лет				
44	Облучение гамет родителей, внутриутробное и постнатальное облучение		1987 – 1992 г.р 6 – 14 лет	32	19 – 40 лет	Постнатальная (юношеский – средний возраст)	30 – 55
21			1994 – 1995 г.р 5 – 8 лет	22	13 – 17 лет	Постнатальная (пубертатный возраст)	24 – 35 лет
15			1997 – 2007 г.р 2 – 5 лет	21	6 – 11 лет	Постнатальная (преддошкольный – препубертатный возраст)	23 – 33 года
Дети (24 чел.) и родители (26 чел.) – жители «чистых» территорий							
Необлученные дети (1987 – 2006 г.р.) отцов ликвидаторов (79 чел.), облученные отцы – ликвидаторы (31 чел.; 35 – 480 мЗв) и их необлученные жены (31 чел.)							

назад. Средний стаж работы отца или матери на опасном производстве до зачатия ребенка составлял 7 ± 1 лет, при этом средняя ежегодная доза в данной группе была $12,8 \pm 6,8$ мЗв ($0,6 \div 116$ мЗв). Суммарные накопленные дозы за период работы с тритием варьировали от 11 до 481 мЗв, один человек подвергся облучению в дозе 994 мЗв. Контрольную группу составили семьи жителей г. Сарова, не подвергавшиеся радиационному воздействию и соответствующие по возрасту семьям профессионалов-атомщиков. Всего было обследовано 19 семей профессионалов-атомщиков и 23 семьи из контрольной группы. Уровень полиморфизма МНС и МКС изучен у 27 детей, родившихся от облученных родителей, и 26 детей необлученных родителей. Средний возраст отцов, их детей и жен из группы профессионалов-атомщиков на момент обследования составил $66,8 \pm 1,3$ ($53 \div 75$), $37,6 \pm 1,4$ ($17 \div 51$), $64,7 \pm 1,1$ ($54 \div 72$) лет, соответственно.

Изучение **гиперметиляции** CpG – островков промоторов генов основных защитных систем клетки проведено на двух независимых выборках облученных лиц. Первая выборка (смешанная выборка № 1: ликвидаторы аварии на ЧАЭС – 83 чел., профессионалы-атомщики г. Сарова – 21 чел., взрослые жители территорий с радионуклидными загрязнениями $135 - 688$ кБк/м² – 20 чел.; 24–78 лет). Все эти лица были объединены в одну группу и рассмотрены нами в аспекте наличия у них в анамнезе перенесенного облучения.

На время взятия образцов крови ни один человек не имел онкологических заболеваний и острого радиационного синдрома. В обследованную выборку ликвидаторов помимо индивидов, охарактеризованных выше, вошли еще лица старшего возраста, проходившие обследование и лечение в 2003 – 2007 гг. в отделении радиационной медицины ФГБУ "Российский научный центр рентгенорадиологии" Минздрава России.

Контрольная группа включала необлученных индивидов, соответствующих по всем общепринятым показателям (пол, возраст, социально-экономические факторы, вредные привычки и др.) облученной группе (208 чел.).

Кроме того, были обследованы 74 потомка облученных родителей (2–51 год, 29 детей ликвидаторов аварии на ЧАЭС, 29 детей профессионалов-атомщиков, 16 детей – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями, рожденных после аварии на ЧАЭС в 1987-2005 гг.).

Вторая выборка представляла собой 149 работников (от 52 до 86 лет) реакторного и радиохимического производств ПО «Маяк» (выборка № 2), подвергшихся, соответственно, пролонгированному внешнему воздействию γ -излучения и сочетанному внешнему (γ -лучи)/внутреннему (α -частицы, инкорпорированный ²³⁹Pu) облучению (таблица 2). В отличие от предыдущей выборки, сюда вошли две однородные группы облученных лиц, подвергшихся воздействию радиации в результате профессиональной деятельности и имеющих продолжительный стаж работы в условиях одного завода. Контрольная группа включала биологический материал необлученных лиц – жителей г. Озерска, соответствующих по всем общепринятым показателям облученной группе (50 чел.). Уникальный банк ДНК работников ПО «Маяк» создан в клиническом отделе Южно-уральского института биофизики ФМБА России (г. Озерск).

У облученных индивидов и лиц контрольной группы структура онкологической заболеваемости была примерно одинакова, однако у облученных индивидов выявлены

Таблица 2. Характеристика обследованных лиц – облученных работников ПО «Маяк» (выборка № 2) и необлученных индивидов (соответствующая контрольная группа).

	Работники реакторного производства (внешнее воздействие γ -излучения), n = 88	Работники радиохимического производства (сочеранное воздействие γ -/ α -излучения), n = 61	Облученные лица (объединенная группа), n = 149	Необлученные лица, n = 50
Возраст, лет				
Диапазон	53 – 86	52 – 84	52 – 86	66 – 86
M \pm m	73,30 \pm 0,69	71,18 \pm 0,76	72,43 \pm 0,52	72,18 \pm 0,65
Пол, муж/жен	69/19	35/26	104/45	34/16
Промежуток времени между окончанием работы и взятием крови, лет				
Диапазон	0 – 59	0 – 61	0 – 61	-
M \pm m	15,95 \pm 1,22	15,4 \pm 1,87	15,74 \pm 1,04	-
Продолжительность работы с радиацией, лет				
Диапазон	2 – 51	1 – 51	1 – 51	-
M \pm m	35,5 \pm 1,01	34,7 \pm 1,7	35,2 \pm 0,9	-
Накопленные дозы (на ККМ), мГр				
γ -излучение				
Диапазон	200 – 2950	142,2 – 1740,9	0 – 2950	-
M \pm m	763,1 \pm 45,1	552,9 \pm 37,9	672,0 \pm 31,9	-
α -излучение				
Диапазон	-	0,63 – 67,7	0 – 67,7	-
M \pm m	-	15,2 \pm 2,1	6,2 \pm 1,04	-
Курение				
курящие (n, %)	72 (81,81)	53 (86,89)	125 (83,89)	36 (72)
некурящие (n, %)	16 (18,18)	8 (13,11)	24 (16,11)	14 (28)
Алкоголь				
употребляющие (n, %)	35 (39,8)	29 (47,54)	64 (42,95)	18 (36)
неупотребляющие (n, %)	53 (60,2)	32 (52,46)	85 (57,05)	32 (64)

злокачественные новообразования лимфоидной ткани (3 случая) и органов дыхания (1 случай). Больше чем у половины обследованных облученных лиц на момент взятия биоматериала или в течение последующих 5 лет были диагностированы цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) и ишемическая болезнь сердца (ИБС), 23 % индивидов этой группы имели онкологические заболевания. ЦВЗ и ИБС зарегистрированы у всех индивидов контрольной группы, а у 46 % лиц выявлены злокачественные опухоли (информация по заболеваемости имелась только для 50 % индивидов).

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по общепринятой методике согласно рекомендациям ВОЗ (1975) и МАГАТЭ (1986) с некоторыми модификациями.

Анализ хромосомных aberrаций проводили путем микроскопирования монохромно окрашенных, с хорошим разбросом метафазных пластинок в соответствии с методическими рекомендациями ВОЗ (1975), МАГАТЭ, Института медицинской генетики АМН СССР (1974). Учитывались aberrации хроматидного и хромосомного типа согласно общепринятой классификации. Учет всех делеций, реципрокных транслокаций, инверсий проводился с применением частичного кариотипического анализа с идентификацией гомологичных хромосом и/или групп хромосом, к которым они относятся. Идентификацию метафаз первого митоза проводили согласно закономерностям дифференциальной окраски сестринских хроматид (Пяткин Е.К., Нугис В.Ю., 1980). Анализировали по 250-500 метафаз в 48-часовых культурах лимфоцитов.

Анализ TCR-мутаций и готовности клеток к апоптозу. Определение количества TCR – мутантных лимфоцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACScan, Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител («Beckman Coulter», Франция) как CD3-негативные клетки среди CD4 – позитивных Т – хелперов (Пинегин Б.В., Ярилин А.А., 2001). Частота мутантов рассчитывалась из соотношения количества клеток с иммунофенотипом CD3⁻CD4⁺, соответствующим клеткам с генными мутациями по локусу TCR, к общему числу CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. О готовности клеток к апоптозу судили по уровню предикторов апоптоза – клеток с иммунофенотипом CD95⁺, экспрессирующих на поверхности мембраны FAS/APO1 – маркер апоптоза, методом проточной цитофлуориметрии.

Анализ мутаций в мини-/микросателлитных локусах ДНК. Характеристика исследованных МНС и МКС локусов представлена в таблице 3. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью наборов Diatom DNA prep (ООО «Лаборатория Изоген»). Для ПЦР-амплификации исследуемых локусов использовались готовые реакционные наборы Generpack STR Scan (ООО «Лаборатория Изоген») и термоциклер «MyCycler» (Bio-Rad). На предварительном этапе были отработаны и оптимизированы условия ПЦР-амплификации ДНК по каждому локусу с целью получения воспроизводимых результатов. Аналитический электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили для МНС – в 1,5%-ном агарозном геле, а МКС – в 8% полиакриламидном геле. Порядок нанесения образцов на гель был стандартизован: отец, ребенок, мать. Документирование гелей проводили в проходящем УФ-свете с помощью

Таблица 3. Характеристика исследованных МКС и МНС локусов.

Локус	Длина повтора, п.н.	Число аллелей локуса	Диапазон размеров аллелей, п.н.	Гетерозиготность, %
МКС				
<i>LPL</i>	4	8	110-138	69,4
<i>VWA</i>	4	12	123-171	82,2
<i>D3S1358</i>	4	9	105-156	78,9
<i>D5S818</i>	4	10	119-155	77,9
<i>D19S433</i>	4	10	104-144	78,5
<i>Penta D</i>	5	16	385-450	86,3
<i>FGA</i>	4	16	241-396	85,9
<i>SE33</i>	4	42	270-320	94,7
<i>Penta E</i>	5	18	379-474	88,2
<i>CSF1P0</i>	4	10	321-357	81,2
<i>D18S51</i>	4	18	290-366	88,2
МНС				
<i>IgH</i>	50	7	470-920	69,0
<i>DIS111</i>	37	14	378-859	67,0
<i>DIS80</i>	16	28	430-650	81,9
<i>ApoB</i>	15	12	541-871	77,5
<i>D17S5</i>	70	11	170-940	86,5

видеосистемы Gel Imager (Россия). С целью выявления новых неродительских полос сравнивались электрофореграммы продуктов ПЦР ДНК родителей и их детей. Во всех случаях при выявлении у потомка неродительской полосы проводилось несколько повторных амплификаций соответствующих МНС и МКС локусов с последующим электрофорезом для получения воспроизводимых результатов.

Анализ гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов (табл. 4) выполнено с применением оптимизированной и стандартизированной в лаборатории метилчувствительной ПЦР, позволяющей диагностировать 0,1 –1 % метилированных аллелей в образце ДНК лейкоцитов крови. Реакцию метилчувствительной ферментативной рестрикции проводили с использованием эндонуклеазы AciI (“Fermentas”, Литва), которая гидролизует только неметилированные участки узнавания (5'...C↓C GC...3'). Для ПЦР - амплификации исследуемых локусов использовались готовые реакционные наборы Genepack (ООО «Лаборатория Изоген») и программируемый термостат “GeneAmp^R PCR System 9700” (США). Положительным контролем амплификации служила негидролизованная ДНК этих же людей. В качестве контроля

Таблица 4. Проанализированные CpG - динуклеотиды в промоторах генов.

Ген	Общее число АсІ sites в изученных фрагментах промоторов	Общее число CpG – динуклеотидов в проанализированных рестрикционных сайтах	Общее число CpG – динуклеотидов в проанализированных фрагментах промоторов	Проанализированные CpG - динуклеотиды (%)
<i>p16/INK4A</i>	2	2	23	8,7 %
<i>p14/ARF</i>	3	3	35	8,6 %
<i>RASSF1A</i>	7	7	32	21,9 %
<i>GSTP1</i>	4	4	31	12,9%
<i>TP53</i>	3	3	12	25%
<i>ATM</i>	6	6	49	12,2%
<i>SOD3</i>	6	6	35	17,1%
<i>ESR1</i>	2	2	24	8,3%

сохранности ДНК после гидролиза (исключение ложноотрицательного результата) проводили амплификацию гена *RAR-β2*, не содержащего участков узнавания используемой рестриктазы. Присутствие на электрофореграмме визуализированной четкой полосы, но характеризующейся «слабым» сигналом в результате амплификации гидролизованной ДНК, указывало на малое количество метилированных аллелей (промоторов) в образце ДНК. Результаты каждого анализа были воспроизведены в трех независимых экспериментах по постановке рестрикции с последующей амплификацией образцов ДНК.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программ WINPEPI (PEPI-for-Windows) (Abramson J.H., 2011), WinStat для Excel, SPSS 20.0.0. общепринятыми статистическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитогенетические эффекты у обследованных лиц. Чтобы исключить влияние той или иной патологии на состояние генома обследованных детей, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, был проведен анализ цитогенетического статуса в зависимости от наличия различных заболеваний у индивидов. Не выявлено значимых различий в частотах простых и обменных aberrаций хромосомного типа – маркеров радиационного воздействия в зависимости от структуры заболеваемости. У детей с заболеваниями нервной системы (вегето-сосудистая дистония, астено-невротические расстройства), включая тяжелые поражениями ЦНС (энцефалопатии, гипертензионно-гидроцефальный синдром, эпилепсия) только частота хроматидных фрагментов превышала соответствующий показатель в группе детей с заболеваниями, имеющими инфекционно-аллергическую природу ($p < 0,02$). Аналогичные выводы сделаны и при исследовании выборки детей – потомков ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Эти данные подтверждают то, что радиация не является мутагенным

фактором, индуцирующим специфическую патологию. Исключение составляют некоторые опухолевые заболевания, в частности лейкозы (Домрачева Е.В., 2002).

Предпринятое нами посемейное изучение дисгеномных эффектов у детей выше рассмотренных групп и родителей, позволило охватить все основные периоды онтогенетического развития, на которое пришлось радиационное воздействие, в том числе оценить последствия облучения родителей в разные критические периоды детства для их потомков. Полученные результаты свидетельствуют о значимо повышенных уровнях тех или иных цитогенетических нарушений в обоих поколениях обследованных людей, постоянно проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами. Частоты aberrантных геномов у детей и взрослых в 1,5-3 раза превышают контрольный уровень (рис. 2). Повышенные частоты хромосомных нарушений у детей, подвергшихся постнатальному или внутриутробному облучению во время аварии на ЧАЭС в 1986 г. и постоянно проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами, выявлены и в других исследованиях, проведенных, как правило, в течении первых 10-15 лет после аварии на ЧАЭС (Елисеева И.М. и др., 1994; Roberto V. et al., 1998; Пилинская М.А. и др., 1992, 1995, 2001; Севаньяев и др., 1995, 2005, 2006; Степанова Е.И. и др., 2007; Михайлова Г.Ф., 2007; и др.). Аналогичные цитогенетические эффекты наблюдаются и у взрослого населения (Бездробная Л.К. и др., 2002; Тарасенко Л.В. и др., 2004; Шевченко В.А., Снигирева Г.П., 2006; Снигирева Г.П. и др., 2011).

Хотя средние уровни aberrантных клеток и aberrаций хроматидного типа у облученных детей и их родителей значимо не отличались, частоты aberrаций хромосомного типа явно преобладали у родителей. В частности, у родителей, дети которых родились в первые годы после аварии на ЧАЭС (1987-1992 гг.), уровни простых aberrаций хромосомного типа статистически значимо превышали таковые у их потомков ($p=0,008$). У детей 1997-2007 гг. р. частоты простых и обменных aberrаций хромосомного типа существенно были ниже таковых у их родителей ($p=0,009$ и $p=0,0007$, соответственно). Кроме того, те или иные цитогенетические показатели у детей, подвергшихся облучению во время аварии, были значимо ниже таковых у взрослых лиц, проживающих в условиях радиационного воздействия в малых дозах. Очевидно, это связано с большей продолжительностью контакта обследованных родителей с другими мутагенными факторами (химические загрязнители окружающей среды, продукты бытовой химии, пищевые красители, консерванты и т. д.). В конечном итоге, имеет место потенцирование повреждений генома, которые лежат в основе «истинной» спонтанной геномной нестабильности, обусловленной генотоксическими эффектами продуктов нормального метаболизма клеток. Это может приводить к повышенной чувствительности организма к низкоинтенсивному действию радиации в малых дозах.

Как видно, частоты aberrаций хромосом у детей 1994-1995 и 1997-2007 гг. р. не отличаются значимо от таковых у детей, непосредственно облученных во время аварии на ЧАЭС (в постнатальный или антенатальный период онтогенеза) и продолжавших проживать (в течение 10 - 15 лет до обследования) на территориях с радионуклидными загрязнениями (рис. 2). При этом, следует подчеркнуть, что

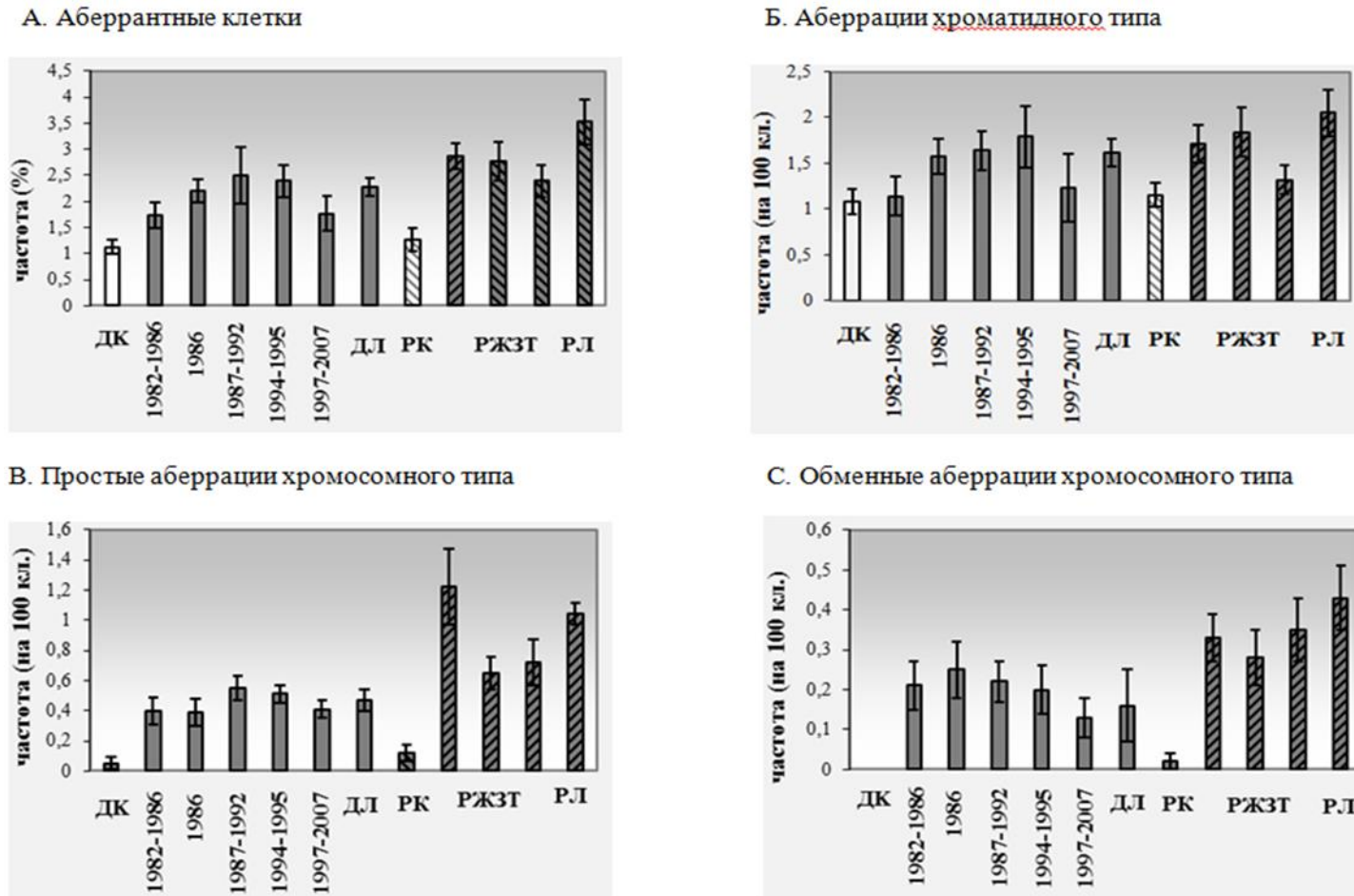


Рис. 2. Цитогенетические показатели у детей и родителей, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС. ДК и РК – дети и родители контрольной группы, соответственно. ДЛ и РЛ – дети ликвидаторов и отцы-ликвидаторы, соответственно. РЖЗТ – родители, проживающие на территориях с радионуклидными загрязнениями (слева направо: родители детей 1987-1992, 1994-1995 и 1997-2007 гг.р., соответственно). По оси абсцисс указан год рождения детей – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями. Из группы облученных во время аварии детей 1982-1986 гг.р. (воздействие в постнатальный период онтогенеза) были исключены дети с зарегистрированной высокой дозой на щитовидную железу (2000 мЗв и выше).

дети 1982–1986 гг. р. накопили наибольшую среднюю эффективную дозу облучения к моменту обследования, которая на основании справочных данных приблизительно составляет 30–35 мЗв и многократно превышает таковую у детей, родившихся после аварии в 1994–2007 гг. (~ 4–6 мЗв). Регрессионный анализ также показал отсутствие зависимости частоты аберрантных клеток от года рождения детей (1982–2007 гг.) – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями ($r=-0,15$; $p=0,06$). С чем это связано?

Во-первых, нельзя исключать такие радиобиологические особенности низкоинтенсивного действия радиации в малых дозах, как феномен гиперчувствительности (Marples, 1997; Martin L.M. et al., 2013), имеющий место у детей, родившихся спустя много лет после аварии на ЧАЭС. Этот феномен, по-видимому, связан с наличием пороговой дозы радиации для активизации защитных механизмов клеток. Во-вторых, может иметь место индуцированная геномная нестабильность как результат внутриутробного облучения организма за счет накопившихся в организме матери радионуклидов. В-третьих, дети 1987-1992 гг. р. и 1994-2007 гг. р. являются потомками обоих облученных родителей. Причем родители детей 1994-2007 гг. р. подверглись максимальному облучению во время аварии на ЧАЭС в 1986 г. в преддошкольный/дошкольный и препубертатный/пубертатный периоды детства, которые рассматриваются как критические периоды онтогенеза (Сипягина А.Е. и др., 2017, 2018; Балева Л.С. и др., 2015, 2016, 2019). Таким образом, становление репродуктивных функций будущих родителей и их последующий период жизни проходили в условиях действия радиации в малых дозах. Следовательно, дозовая нагрузка на гонады обусловлена не только внешним, но внутренним облучением за счет инкорпорированных в организме радиоактивных изотопов. Вероятно, у части обследованных индивидов, помимо мутагенных эффектов, индуцированных в результате непосредственного действия радиации на геном клеток, имеет место нестабильность генома, которая передается трансконгенерационно через гаметы облученных родителей и реализуется в активно пролиферирующих клетках детского организма.

Ранее нами были приведены экспериментальные доказательства пострадиационной индукции геномной нестабильности в растущем организме 15 детей – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями, как подвергшихся внутриутробному облучению в 1986 году, так и являющихся потомками облученных родителей (1987–1991 гг. р. и 1994–1998 гг. р.) (Кузьмина Н.С., 2003). Позже аналогичные выводы были сделаны и в других исследованиях (Aghajanyan A.V., Suskov I.I., 2009; Пилинская М.А. и др., 2011). Во всех этих работах отмечается высокая индивидуальная вариабельность выраженности данного феномена.

Несмотря на то, что доза, аккумулированная ликвидаторами при фракционированном облучении на протяжении нескольких недель – месяцев, в основном, многократно превышает таковую, накопленную к моменту обследования взрослыми жителями территорий с радионуклидными загрязнениями, средние уровни обменных аббераций хромосомного типа между

этими группами индивидов значимо не отличались. Только частоты простых aberrаций хромосомного типа были ниже у лиц, проживающих в условиях низкоинтенсивного воздействия радиации и подвергшихся облучению во время аварии будучи детьми и подростками (рис. 2).

Рассматриваемые цитогенетические показатели у необлученных детей, родившихся от облученных отцов-ликвидаторов, были существенно повышены по сравнению с контролем. Кроме того, они не отличались значимо от таковых у детей, проживающих в условиях хронического действия радиации в малых дозах и родившихся после аварии на ЧАЭС в 1986–1995 гг. Уровни aberrантных клеток, хроматидных фрагментов и простых aberrаций хромосомного типа у детей ликвидаторов оказались существенно выше, чем у детей самой младшей возрастной группы 1997-2007 гг. р. ($p=0,048$; $p=0,027$ и $p=0,035$, соответственно), родившихся от облученных родителей. Частоты aberrантных клеток и хроматидных фрагментов у детей ликвидаторов значимо превышали таковые показатели у облученных детей, родившихся до аварии ($p=0,048$ и $p=0,028$, соответственно) (рис. 2). Полученные данные являются доказательством «чистой» трансгенерационной геномной нестабильности у потомков облученных родителей, согласуются с выводами, сделанными другими исследователями (Воробцова И.Е., Семенов А.В., 2006; Степанова Е.И. и др., 2004; Пилинская М.А. и др., 2011) и не исключают дозозависимый характер этого феномена.

Иммуногенетические показатели. С целью углубленного анализа спектра проявлений трансгенерационной нестабильности генома и ее индивидуального характера у детей облученных родителей нами предпринято одновременное изучение нескольких генетических показателей у ликвидаторов аварии на ЧАЭС и их потомков. Как у облученных отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС, так и у их необлученных детей, помимо выше рассмотренных цитогенетических нарушений, выявлены существенно повышенные уровни TCR-мутантных лимфоцитов и предикторов апоптоза ($CD95^+$ -лимфоциты). У ликвидаторов эти частоты несколько превышали (но незначимо) соответствующие параметры у их детей. В обоих поколениях выявлен высокий размах индивидуальной вариабельности изученных показателей (табл. 5). Повышенные уровни TCR-мутаций в отдаленный период после облучения отмечался и другими исследователями (Замулаева И.А. и др., 2006; Смирнова С.Г. и др., 2012; Орлова Н.В. и др., 2019).

В результате анализа сопряженности между изученными показателями выявлены отличительные особенности, характерные для индукции геномной нестабильности в организме необлученных детей, по сравнению с отцами-ликвидаторами, перенесшими непосредственное радиационное воздействие. У ликвидаторов наблюдалась положительная ассоциативная связь между частотой aberrантных клеток и уровнем TCR – мутантных лимфоцитов ($r = 0,723$; $p = 0,0005$). У большинства облученных отцов высокие уровни TCR-мутаций сопровождалось повышенной частотой aberrаций хромосомного типа: коэффициент корреляции между уровнем генных мутаций и этими цитогенетическими нарушениям составил $r = 0,542$ ($p = 0,012$). Напротив, у необлученных детей ассоциативные связи между уровнем TCR – мутантных лимфоцитов и частотой aberrантных клеток (а также других цитогенетических

показателей) отсутствовали ($|r| \leq 0,34$; $p \geq 0,2$). У облученных отцов выявлена положительная корреляционная связь между уровнями аберрантных клеток и предикторов апоптоза ($r = 0,618$; $p = 0,007$), что не наблюдалось у их детей ($r = 0,237$; $p = 0,099$).

Таблица 5. Средние частоты иммуногенетических показателей в обследованных группах отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС и их детей.

Показатель	Средняя частота ($M \pm SE$), %			
	отцы - ликвидаторы (n=17)	дети ликвидаторов (n=34)	контроль дети (n=10)	контроль взрослые (n=10)
TCR – мутантные лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	0,049 ± 0,011* (0 ÷ 0,165)	0,040 ± 0,007** (0 ÷ 0,205)	0,015 ± 0,003 (0 ÷ 0,030)	0,018 ± 0,005 (0,005 ÷ 0,035)
CD95 ⁺ - лимфоциты (предикторы апоптоза)	26,49 ± 4,73* (2,9 ÷ 62)	20,24 ± 3,66** (0 ÷ 75,3)	10,15 ± 2,10 (0 ÷ 19)	11,52 ± 2,75 (0 ÷ 25)

Примечание. В скобках показан размах варьирования индивидуальных показателей. Значимость различий по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Результаты кластеризации совокупности полученных данных показывают, что по сравнению с детьми, в группе ликвидаторов преобладают лица с высоким уровнем предикторов апоптоза в сочетании с повышенной частотой аберрантных/TCR–мутантных клеток. Напротив, в группе детей преобладали индивидуумы с низкими уровнями CD95⁺ клеток в сочетании с повышенной частотой TCR – мутантных/аберрантных лимфоцитов (рис. 3, табл. 6). Последнее может указывать на индуцированную трансгенерационную геномную нестабильность клеток растущего организма, приводящую к нарушению реализации программы их апоптотической гибели. По всем изученным критериям наблюдались индивидуальная вариабельность дестабилизации генома, которая проявлялась как разнообразием спектра трансгенерационных мутационных эффектов, так и различной степенью их выраженности.

Можно полагать, что апоптоз, с одной стороны, является системой защиты организма от мутантных клеток, а с другой – показателем поврежденности клеточных геномов. По-видимому, в связи с этим наблюдается значимая высокая положительная корреляционная связь между уровнями предикторов апоптоза у ликвидаторов и их детей ($r = 0,735$; $p = 0,001$), а также между частотой CD95⁺ клеток у облученных отцов и уровнем аберрантных клеток у их потомков ($r = 0,745$; $p = 1,3 \cdot 10^{-4}$). Отмечена положительная корреляционная связь между суммарной частотой разрывов хроматид у ликвидаторов и их детей ($r = 0,454$; $p = 0,009$). Коэффициент корреляции для частот аберрантных клеток был несколько ниже и составил $r = 0,323$ ($p = 0,031$).

Таблица 6. Характеристика полученных кластеров (кластеризация цитогенетических и иммуногенетических показателей в группе ликвидаторов аварии на ЧАЭС и их необлученных детей).

Номер кластера (число лиц)	Средняя частота, %			Характеристика кластера
	аберрантные клетки	TCR – мутантные клетки	CD95 ⁺ - клетки	
1 (12)	2,2	4,4	36,9	Все изученные показатели повышены по сравнению с контролем
2 (6)	3,3	1,8	60,8	Значительно повышены частота аберрантных клеток и уровень предикторов апоптоза. Уровень TCR-мутаций – норма.
3 (13)	2,0	2,5	12,3	Несколько повышены частоты аберрантных клеток и TCR - мутаций. Уровень предикторов апоптоза – норма.
4 (14)	1,9	6,6	4,0	Несколько повышена частота аберрантных клеток, значительно повышен уровень TCR-мутаций, очень низкий уровень апоптоза
Контрольная выборка (дети + взрослые)	1,41±0,13	1,60±0,37	10,52±2,85	

Примечание. Данные, полученные для контрольной выборки, кластеризации не подверглись.

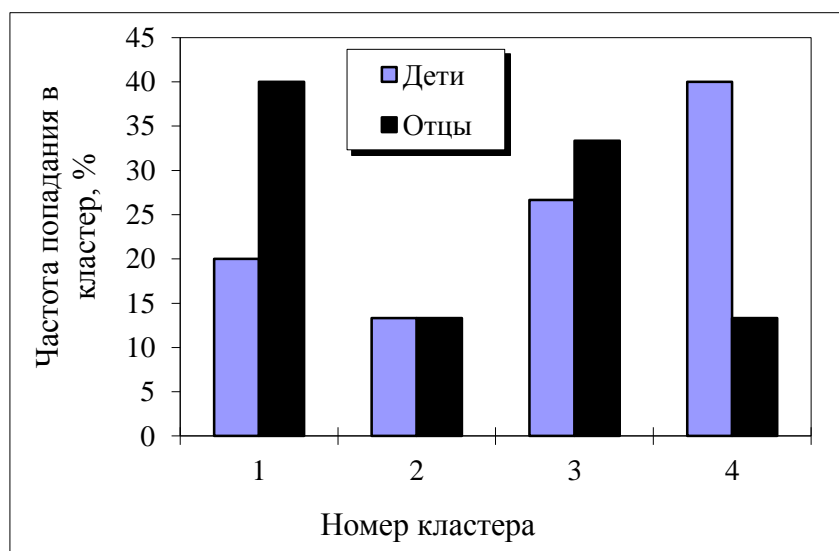


Рис. 3. Гистограмма частот попадания в кластеры для отцов-ликвидаторов и их необлученных детей.

Показано отсутствие зависимости частот aberrантных клеток и TCR-мутаций у детей ликвидаторов от промежутка времени между облучением отцов и зачатием детей ($r = -0,18$, $p = 0,24$ и $r = 0,155$, $p = 0,191$, соответственно).

Мутации в гипервариабельных tandemных повторах ДНК. Результаты анализа мутаций МНС локусов в 19 семьях профессионалов-атомщиков (27 детей), подвергшихся хроническому воздействию β -излучения трития и его окиси, представлены в таблице 7. В сумме, по всем 5 исследованным полиморфным МНС локусам выявлены мутации у 2-х из 26 обследованных детей контрольной группы (неродительский аллель локуса *DIS111* и 1 нуль-мутация - потеря родительского аллеля по локусу *IgH*) и у 2-х детей основной группы (неродительские аллели *D17S5* и *IgH*). Средняя частота МНС мутаций в группе профессионалов-атомщиков составила 3% (0,03 на локус на чел.), а в контрольной группе в 2 раза меньше – 1,5%, однако эти различия не значимы ($p=0,68$)

Таблица 7. Результаты анализа мутаций в минисателлитных локусах у детей профессионалов – атомщиков.

Локус	Количество выявленных мутаций	
	Контроль	Профессионалы
<i>DIS80</i>	0	0
<i>ApoB</i>	0	0
<i>D17S5</i>	0	2
<i>IgH</i>	1	2
<i>DIS111</i>	1	0
Всего	2 (1,5%)	4 (3,0%)

Результаты анализа мутаций в МКС локусах в обследованных семьях профессионалов-атомщиков представлены в таблице 8. В сумме по 11-ти МКС локусам выявлены мутации у 2-х детей контрольной группы и у 6-ти детей – потомков облученных родителей. Средняя частота МКС мутаций в группе профессионалов-атомщиков составила 4,7% и превысила аналогичный показатель в контрольной группе (0,7%) почти в 9 раз. Различия между группами статистически значимы ($p=0,004$).

Однако, следует отметить, что у двух детей из одной семьи обнаружены мутации по 4 МКС локусам. У этих же детей были выявлены и неродительские полосы по МНС локусам *DIS111* и *IgH*. Суммарная доза облучения, полученная отцом – около 1000 мЗв, т.е. в несколько раз выше, чем величина средней дозы для всей обследованной группы профессионалов-атомщиков. Если эту семью не включать в статистический анализ, то частота МКС мутаций у детей профессионалов-атомщиков составит 2,18%, что в 3 раза превышает аналогичный показатель в контрольной группе. Однако, различия между группами не значимы ($p = 0,101$). Выявленные другими исследователями значимо повышенные средние частоты мутаций в МНС локусах имели место только в случае хронического многолетнего облучения (Dubrova Y.E. et al., 1996, 1997, 2002, 2006; Dubrova Y.E., 2006, 2016, 2019; Аклеев, 2007; UNSCEAR, 2001). Таким образом, отмеченная тенденция к повышенной частоте МКС мутаций у детей профессионалов-

атомщиков по сравнению с контролем, может свидетельствовать о генотоксических последствиях хронического действия β -излучения трития на клетки генеративной системы организма.

Таблица 8. Результаты анализа мутаций в микросателлитных локусах у детей профессионалов – атомщиков.

Локус	Количество выявленных мутаций	
	Контроль	Профессионалы
<i>D3S1358</i>	2	0
<i>LPL</i>	0	1
<i>VWA</i>	0	2
<i>D5S818</i>	0	2
<i>D19S433</i>	0	1
<i>FGA</i>	0	0
<i>SE33</i>	0	2
<i>D18S51</i>	0	1
<i>Penta E</i>	0	4
<i>Penta D</i>	0	0
<i>CSF1PO</i>	0	1
Всего	2 (0,7%)	14 (4,7%)

Эти генетические нарушения могут быть как результатом мутационных событий, возникших в клетках зародышевой линии отца в результате непосредственно действия радиации, так и индукции нестабильности генома в ходе активной пролиферации предшественников зрелых гамет – сперматогоний.

Гиперметилирование CpG - островков промоторов генов. В таблицах 9, 10 и рис. 4 суммированы результаты анализа метилирования CpG островков промоторов генов клеточного цикла (*RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*) и детоксикации (*GSTP1*) у 124 облученных индивидов первой гетерогенной выборки (смешанная выборка № 1: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями), а также у 74 их потомков. В целом, как видно из рис. 4, доля лиц, подвергшихся радиационному воздействию, с выявленными случаями метилирования промоторов 1-го и/или 2-х локусов была существенно выше ($p = 3,9 \cdot 10^{-7}$), чем в контрольной группе. Частота случаев метилирования изученных генов у необлученных детей, родившихся от облученных родителей, не отличается от таковой в контроле (мощность теста около 90%). В этой связи в дальнейшем анализе потомки облученных лиц были отнесены к контрольной группе.

Как видно из табл. 9, частота случаев гиперметилирования генов *RASSF1A* и *p14/ARF* увеличивается с возрастом как у облученных пациентов, так и у лиц контрольной группы. Напротив, доля пациентов с выявленным эпигенетическим маркированием промоторов генов *p16/INK4A* и *GSTP1* значительно выше у облученных лиц, чем в контроле, что касается обеих возрастных категорий.

Проведенный корреляционный и множественный регрессионный анализы подтверждают дифференциальную роль возраста и фактора облучения в метилировании различных генов. Так общие корреляции «гиперметилирование ~ воздействие радиации» и «гиперметилирование ~ возраст» были значимы для всех

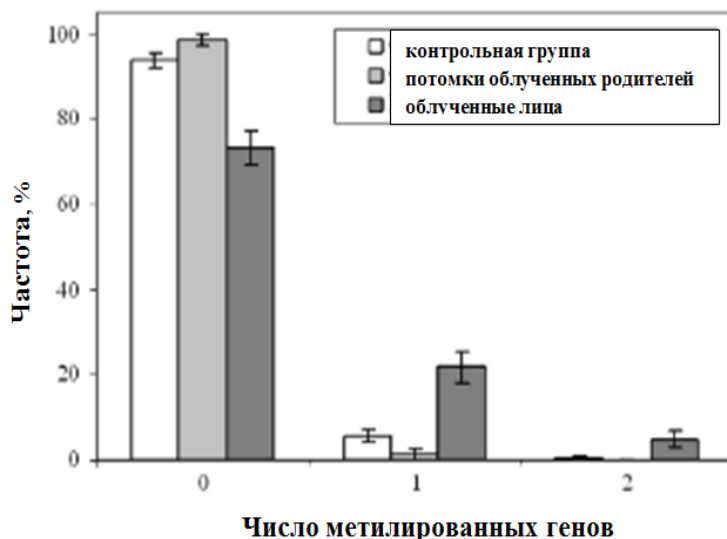


Рис. 4. Распределение суммарного числа метилированных локусов у лиц обследованных групп.

Облученные лица – смешанная выборка № 1 (ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы - атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями)

Таблица 9. Число случаев метилирования промоторов изученных генов у облученных (смешанная выборка № 1) и необлученных лиц двух возрастных категорий.

Локус	Моложе 45 лет			Старше 45 лет		
	Контроль (209)	Облученные (34)	Эффект облучения	Контроль (73)	Облученные (90)	Эффект облучения
<i>RASSF1A</i>	2 (1,0)	1 (2,9)	OR = 3,1 p = 0,365	6 (8,2)	9 (10,0)	OR = 1,2 p = 0,789
<i>p14</i>	0 (0,0)	1 (2,9)	OR = 18,7 p = 0,140	4 (5,5)	5 (5,6)	OR = 1,0 p = 1,0
<i>p16</i>	0 (0,0)	4 (11,8)	OR = 61,8 p = $3,3 \cdot 10^{-4}$	1 (1,4)	8 (8,9)	OR = 7,0 p = 0,043
<i>GSTP1</i>	1 (0,5)	3 (8,8)	OR = 20,1 p = $9,2 \cdot 10^{-3}$	1 (1,4)	8 (8,9)	OR = 7,0 p = 0,043

генов. Чтобы проверить обусловленность этих корреляций влиянием третьего фактора, были рассчитаны частные корреляции (табл. 10). Корреляции облучения с метилированием генов *RASSF1A* и *p14/ARF* исчезают при фиксированном

возрасте, но остаются значимыми для генов *p16/INK4A* и *GSTP1*. Напротив, при фиксированном статусе облучения, корреляции с возрастом исчезают для генов *p16/INK4A* и *GSTP1* (табл. 10). Параметры моделей множественной регрессии, описывающих ассоциации числа метилированных генов с возрастом и облучением, подтверждают выявленные закономерности: гиперметилирование локусов *RASSF1A* и *p14/ARF* обусловлено возрастом ($\beta = 0,242$; $p = 1,7 \cdot 10^{-5}$), а генов *p16/INK4A* и *GSTP1* – фактом экспонирования ($\beta = 0,290$; $p = 1,7 \cdot 10^{-7}$).

Таблица 10. Общие и частные корреляции метилирования с возрастом и облучением.

	<i>RASSF1</i>	<i>p14/ARF</i>	<i>p16/INK4A</i>	<i>GSTP1</i>
Воздействие	0,117 (0,018)	0,102 (0,041)	0,244 ($6,5 \cdot 10^{-7}$)	0,214 ($1,4 \cdot 10^{-5}$)
Воздействие (возраст фиксирован)	0,011 (0,825)	0,032 (0,523)	0,186 ($1,7 \cdot 10^{-4}$)	0,182 ($2,4 \cdot 10^{-4}$)
Возраст	0,216 ($1,1 \cdot 10^{-5}$)	0,149 ($2,5 \cdot 10^{-3}$)	0,171 ($5,4 \cdot 10^{-4}$)	0,115 (0,021)
Возраст (статус облучения фиксирован)	0,183 ($2,0 \cdot 10^{-4}$)	0,114 (0,021)	0,059 (0,238)	0,010 (0,844)

Примечание. В скобках показано значение p-value.

Проведенные эпигенетические исследования независимой выборки облученных лиц с рассчитанной и документированной дозой облучения (выборка № 2: работники реакторного и радиохимического производств ПО «Маяк») верифицируют данные о дифференциальных эффектах возраста и радиационного воздействия в метилировании CpG-островков промоторов разных генов, полученные на первой выборке (смешанная выборка № 1) (рис. 5). Как видно, частота случаев гиперметилирования промоторов локусов *p16/INK4A* и *GSTP1* у облученных лиц двух рассматриваемых выборок статистически значимо

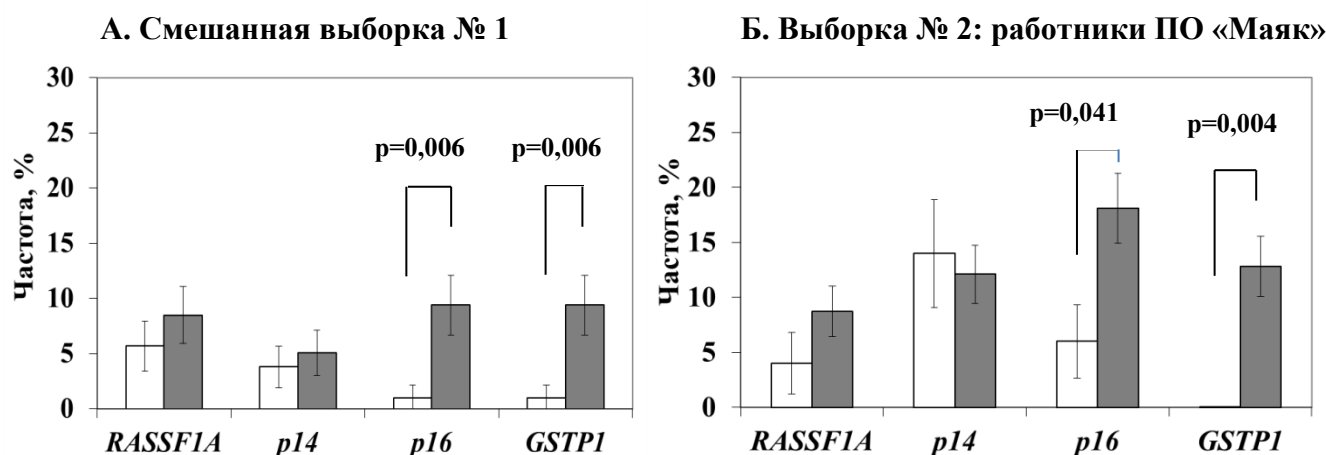


Рис. 5. Выявленные случаи гиперметилирования промоторов генов при анализе двух независимых выборок облученных и необлученных лиц.

превышала аналогичный показатель в соответствующей контрольной группе. Статистически значимых различий в частоте пациентов с метилированием генов *RASSF1A* и *p14/ARF* между экспонированной и соответствующей контрольной группой в обоих исследованиях не обнаружено. Таким образом, в обеих выборках наблюдались **однаправленные эффекты** (рис. 5).

Расширение спектра анализируемых генов при изучении гиперметилирования ДНК у работников ПО «Маяк» позволило выявить совокупность *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1* локусов, гиперметилирование которых ассоциировано с радиационным воздействием. Показано, что метилирование генов *p14/ARF* и *RASSF1A* обусловлено исключительно возрастом (логистическая регрессия: $p=0,010$), но не перенесенным радиационным воздействием ($p=0,846$). Для остальных 6 генов (*p16/INK4A*, *GSTP1*, *p53*, *ATM*, *SOD3*, *ESR1*) возрастная зависимость метилирования отсутствует ($p=0,541$), но обнаруживается существенная сопряженность с воздействием ионизирующей радиации ($p=1,9 \cdot 10^{-4}$). Результаты ROC-анализа свидетельствуют о значимой сопряженности статуса «облученный» с метилированием хотя бы одного из этих генов: $AUC = 0,69 \pm 0,04$, $p = 5,9 \cdot 10^{-5}$, 95% CI 0,606–0,763.

Информативность рассмотрения выявленных эпигенетических нарушений как биомаркеров перенесенного отдаленного облучения сопоставима с таковой, ранее полученной для цитогенетических перестроек – дицентриков и колец ($AUC = 0,699 \pm 0,038$, $p = 1,4 \cdot 10^{-6}$, 95% CI 0,625 – 0,773; данные получены в лаборатории на выборке ликвидаторов аварии на ЧАЭС).

Среди облученных лиц выявлена существенно повышенная частота индивидов с метилированием промоторов хотя бы одного из этих 6 генов в лейкоцитах крови по сравнению с таковым показателем у лиц группы сравнения ($p=2,3 \cdot 10^{-4}$). Среди работников ПО «Маяк» доля индивидов с гиперметилированием CpG-островков промоторов генов *p16/INK4A*, *GSTP1* и *SOD3* статистически значимо превышала аналогичные показатели в группе необлученных лиц. Для остальных трех локусов (*p53*, *ATM*, *ESR1*) выявлена тенденция к более высокой частоте встречаемости облученных индивидов с aberrантным метилированием, что особенно характерно для генов *p53* и *ATM* (табл. 11).

Наибольшая доля индивидов – носителей эпигенетических нарушений 2-х и 3-х генов наблюдалась в группе работников радиохимического производства, подвергшихся сочетанному действию внешнего γ -/внутреннего α -излучений (рис. 6).

Выявлена статистически значимая сопряженность накопленной дозы облучения и числа метилированных промоторов ($r = 0,289$, $p = 3,4 \cdot 10^{-5}$ и $r = 0,179$, $p=0,011$ для воздействия γ - и α -излучений, соответственно) (рис. 7). Непараметрический ANOVA тест (критерий Краскала – Уоллиса) также показал существенные различия между группами лиц, имеющих разное число метилированных генов, по величине накопленных доз облучения ($p = 0,001$ и $p = 0,009$ для воздействия γ и α -излучений, соответственно).

Таблица 11. Выявленные случаи гиперметилирования промоторов генов у облученных лиц (выборка № 2: работники ПО «Маяк») и соответствующей контрольной группы.

Ген	Число случаев метилирования промотора (%)		Эффект радиационного воздействия	
	контроль (n = 50)	облученные работники (n = 149)	OR (95% CI)	p – value*
<i>p16/INK4A</i>	3 (6,0)	27 (18,1)	3,47 (1,09-14,92)	0,041
<i>GSTP1</i>	0 (0,0)	19 (12,8)	4,35 (1,46-12,89)	0,004
<i>p53</i>	3 (6,0)	24 (16,1)	3,01 (0,87-10,46)	0,094
<i>ATM</i>	1 (2,0)	15 (10,1)	5,49 (0,80-235,55)	0,078
<i>SOD3</i>	9 (18,0)	60 (40,3)	3,07 (1,40-6,73)	0,006
<i>ESR1</i>	4 (8,0)	19 (12,8)	1,68 (0,52-7,59)	0,451
<i>Хотя бы один ген</i>	17 (34,0)	96 (64,9)	3,62 (1,76-7,46)	$2,3 \cdot 10^{-4}$
<i>Мета-анализ всех генов**</i>			3,38 (2,05-5,56)	$1,7 \cdot 10^{-7}$

*Двусторонний точный тест Фишера

** Тест Мантеля - Хензеля

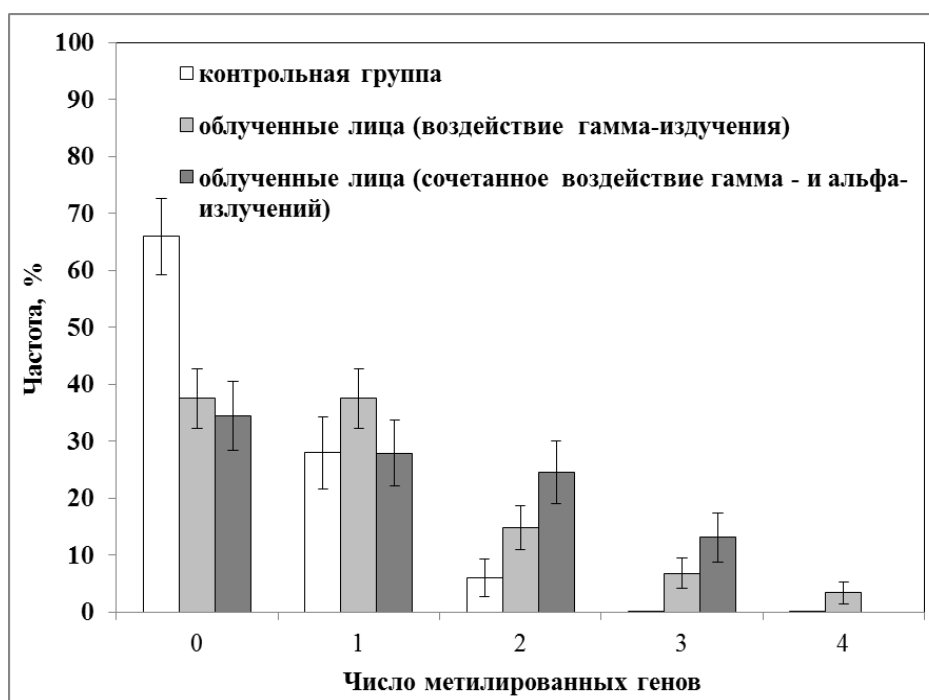


Рис. 6. Распределение суммарного числа метилированных промоторов у обследованных облученных работников ПО «Маяк» и в соответствующей контрольной группе.

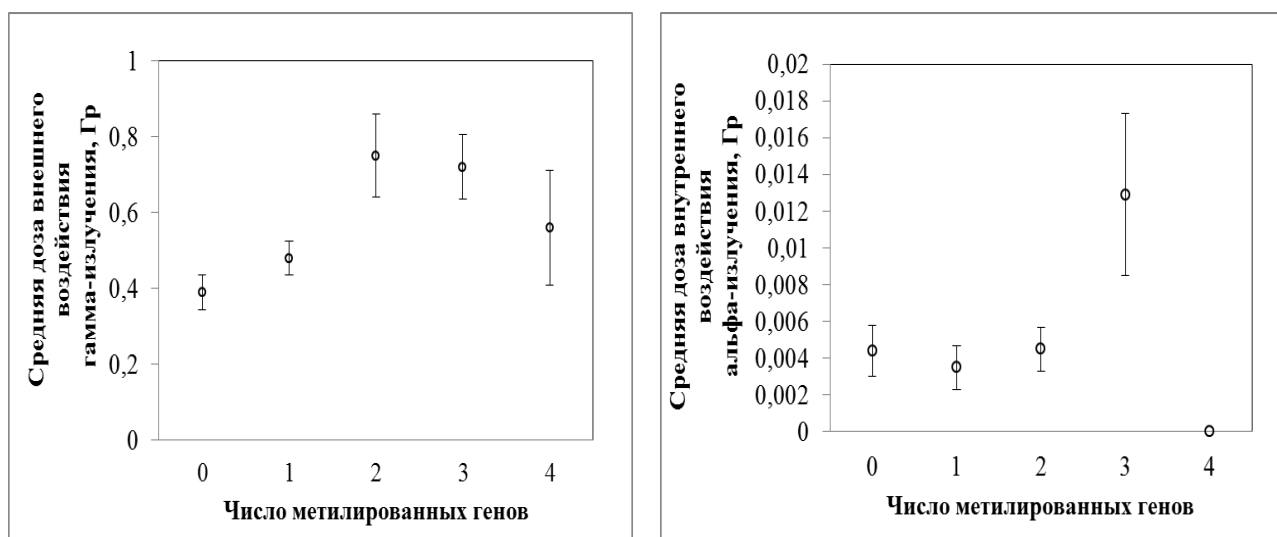


Рис. 7. Средние дозы (А) внешнего воздействия γ -излучения и (Б) внутреннего воздействия α -излучения у обследованных работников ПО «Маяк» с различным числом метилированных генов (в анализ включены все облученные лица и контрольная выборка).

При рассмотрении объединенной выборки необлученных лиц и лиц, подвергшихся исключительно сочетанному воздействию внешнего γ -внутреннего α -излучений, обнаруживается еще большая корреляция накопленной дозы воздействия γ -излучения и числа метилированных промоторов ($r=0,415$, $p=5,9 \cdot 10^{-6}$). Соответствующая корреляция с дозой воздействия α -излучения была несколько ниже ($r = 0,362$, $p = 9,4 \cdot 10^{-5}$).

На первой выборке облученных лиц (смешанная выборка № 1) изучена сопряженность между рассмотренными цитогенетическими и эпигенетическими показателями. Выявлена значимая ассоциативная связь между числом метилированных локусов и частотой aberrаций хромосомного типа (по Спирмену $r = 0,26$; $p = 0,009$). Эта сопряженность в основном обусловлена генами, проявившими зависимость эпигенетического статуса от перенесенного организмом радиационного воздействия (*p16/INK4A*, *GSTP1*).

Таким образом, частота aberrаций хромосомного типа возрастает с увеличением количества метилированных генов (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, как у родителей, подвергшихся облучению в различных ситуациях (как правило, диапазон малых и средних доз), так и у их облученных и необлученных детей, выявлен комплекс генетических и эпигенетических (у родителей) нарушений. Все это свидетельствует о системном характере дестабилизации генома у облученных лиц и их потомков и является критерием

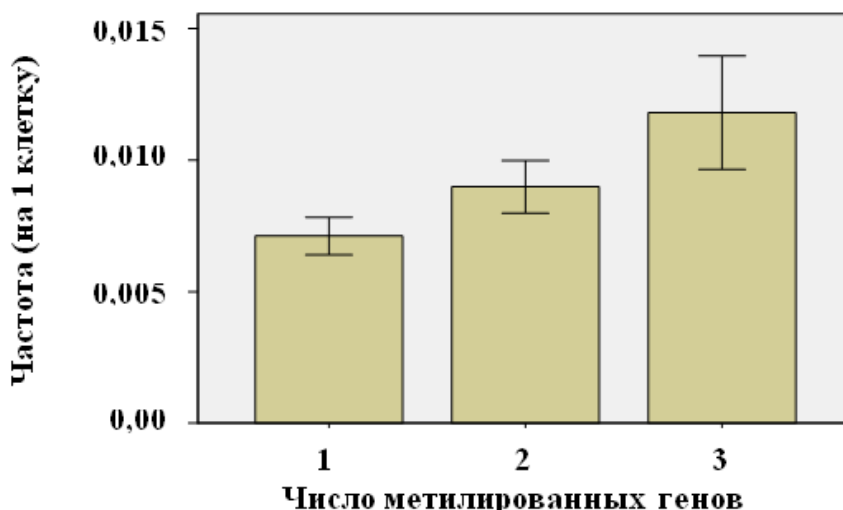


Рис. 8. Частота aberrаций хромосомного типа у облученных лиц в зависимости от общего количества метилированных промоторов.

для выявления индивидов с риском развития радиационно-индуцированной патологии.

Ранее нами была предложена концепция полигеномной реализации мутагенных эффектов в организме человека, основанная на клеточном тиражировании как первично индуцированных, так и отсроченных дисгеномных эффектов, возникающих в активно пролиферирующих клетках организма (Сусков И.И., Кузьмина Н.С., 2003). С целью ее конкретизации и с учетом выше представленных данных, можно сказать, что в организме, подвергнутом пролонгированному воздействию радиации, помимо повреждений генетического аппарата имеет место и накопление клеток с эпигенетическими модификациями, в частности, с гиперметилованием отдельных CpG - динуклеотидов CpG-островков промоторов генов. Все это приводит к изменению пенетрантности/экспрессивности клеточных гено-/фенотипов. Уже экспериментально с использованием нескольких биологических объектов доказано, что генотоксиканты являются мощными индукторами ошибок транскрипции, количество которых существенно превышает уровень регистрируемых реализованных в мутации повреждений ДНК. Речь идет об изменениях транскриптома, затрагивающих все классы РНК-молекул (мРНК, а также рРНК, тРНК и другие нкРНК). Причем для генерации таких РНК-молекул не требуется фиксация первичных повреждений ДНК в конечные эффекты – мутации (Fritsch S. et al., 2021). Поэтому, выявленный нами спектр нарушений генома/эпигенома является не только биоиндикатором генотоксического воздействия радиации, но и может свидетельствовать о развитии функционального дисбаланса клеток организма, приводящего к преждевременному развитию мультифакториальной патологии и ее хронизации у облученных лиц и их потомков.

Расширение спектра генов с целью анализа паттернов метилирования необходимо для создания высокоточной прогностической системы биоиндикации радиационного воздействия, имеющей достаточную информативность в оценке риска преждевременного старения и развития сопряженных с ним патологий.

ВЫВОДЫ

1. Во всех обследованных группах детей – жителей территорий с радионуклидными загрязнениями ($135 - 688 \text{ кБк/м}^2$), родившихся как в ближайшие сроки (несколько месяцев - 5 лет; средние эффективные дозы $\sim 15-35 \text{ мЗв}$), так и в более отдаленный период после аварии на ЧАЭС (средние эффективные дозы $\sim 4-6 \text{ мЗв}$), выявлены существенно повышенные частоты радиационно-индуцированных цитогенетических нарушений. У облученных родителей рассматриваемые показатели превышали таковые у их потомков.
2. Не выявлена зависимость частоты aberrаций хромосом у детей обследованных групп от средней эффективной дозы облучения, что может указывать на индуцированную геномную нестабильность и реальность ее трансгенерационной компоненты у индивидов, родившихся спустя 8 – 19 лет после облучения их родителей в 1986 году в критические периоды онтогенеза.
3. Как у отцов-ликвидаторов аварии на ЧАЭС ($35 - 480 \text{ мЗв}$), так и у их необлученных детей выявлены значимо повышенные частоты aberrаций хромосом, TCR – мутаций и предикторов апоптоза (CD95^+ - лимфоциты). У детей, в отличие от их облученных отцов, не выявлены корреляционные связи между уровнями TCR – мутаций и aberrаций хромосом, частотами aberrантных клеток и предикторов апоптоза.
4. У потомков облученных отцов-ликвидаторов по всем изученным критериям наблюдались индивидуальная вариабельность дестабилизации генома, которая проявлялась как разнообразием спектра трансгенерационных мутационных эффектов, так и различной степенью их выраженности. Зависимость частот aberrантных/мутантных лимфоцитов от срока зачатия детей после аварии отсутствовала.
5. У детей – потомков профессионалов-атомщиков, подвергшихся хроническому воздействию β – излучения трития и его окиси ($11-994 \text{ мЗв}$), выявлена тенденция к повышенной средней частоте мутаций в микросателлитных локусах, что свидетельствует об индуцированных генотоксических эффектах в гаметах облученного организма.
6. На двух независимых выборках облученных лиц (дозы от 35 до 2000 мЗв и более) показана значимость радиационного фактора в индукции гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов в лейкоцитах крови, выявляемого в отдаленные сроки после перенесенного облучения.

7. Показана дифференциальная значимость возраста и радиационного воздействия в метилировании CpG-островков промоторов разных генов, что демонстрируют однонаправленные эффекты, наблюдаемые в двух независимых выборках облученных лиц.
8. Выявлена совокупность *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1* локусов, гиперметилирование которых ассоциировано с радиационным воздействием. ROC-анализ показал приемлемую информативность рассмотрения выявленных эпигенетических нарушений как биомаркеров перенесенного облучения, сопоставимую с таковой для цитогенетических перестроек – дицентриков и колец.
9. Выявлена зависимость доза-эффект для гиперметилирования вышеперечисленных генов, которое выявляются в лейкоцитах крови спустя годы и десятилетия после перенесенного пролонгированного внешнего воздействия γ – излучения или сочетанного действия внешнего γ /внутреннего α -излучений.
10. Выявлена положительная ассоциативная связь между поврежденностью генома, индуцированной перенесенным десятилетия назад радиационным воздействием, и гиперметилированием промоторов генов основных защитных систем клеток.
11. В целом, выявлен системный характер генетических/эпигенетических нарушений, сопряженность между изученными показателями в клетках организма в отдаленный период после облучения и разнообразие спектра трансгенерационных эффектов у детей – потомков родителей, подвергшихся радиационному воздействию на разных этапах онтогенеза, в том числе в критические периоды детства.

**Список статей в рецензируемых журналах по теме диссертации
(входят в перечень ВАК и/или БД РИНЦ, Scopus, WoS)**

1. Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах. Радиобиология. Радиоэкология. 2006. Т.46. № 2. С. 167-177.
2. Кузьмина Н.С., Васильева И.М., Синельщикова Т.А., Семячкина А.Н., Шевченко В.А., Засухина Г.Д. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз и нарушения репарации ДНК. Радиобиология. Радиоэкология. 2006. Т.46. № 4. С. 424-428.
3. Сусков И.И., Агаджанян А.В., Кузьмина Н.С., Елисова Т.В., Иофа Э.Л., Нилова И.Н., Акаева Э.А., Кузнецова Г.И., Рубанович А.В., Цховребова Л.В., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Проблема трансгенерационного феномена геномной нестабильности у больных детей разных возрастных групп после аварии на ЧАЭС. Радиобиология. Радиоэкология. 2006. Т.46. № 4. С.466-474.
4. Кузьмина Н.С., Шипаева Е.В., Семячкина А.Н., Васильева И.М., Коваленко Л.П., Дурнев А.Д., Засухина Т.Д. Полиморфизм генов детоксикации и устойчивость клеток к воздействию мутагенов у пациентов с синдромом Элерса-Данлоса. Бюлл. экспер. биол. и мед. 2007. № 11. С. 560-564.

5. Семячкина А.Н., Новиков П.В., Воинова В.Ю., Курбатов М.Б., Синельщикова Т.А., **Кузьмина Н.С.**, Засухина Г.Д. Синдром Протея у детей: диагностика, лечение и профилактика. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2007, №1, 45-49.
6. Сусков И.И., **Кузьмина Н.С.**, Сускова В.С., Агаджанян А.В., Рубанович А.В. Индивидуальные особенности трансгенерационной геномной нестабильности у детей ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (цитогенетические и иммуногенетические показатели). Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 2. С. 278-286.
7. Сальникова Л.Е., Фомин Д.К., Елисова Т.В., Акаева Э.А., **Кузьмина Н.С.** Лаптева Н.Ш., Нилова И.Н., Иофа Э.Л., Костина Л.Н., Кузнецова Г.И., Куликова Т.А., Панушкина О.Г., Рубанович А.В. Изучение связи цитогенетических и эпидемиологических показателей с генотипами у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 3. С. 303-312.
8. Шайхаев Г.О., **Кузьмина Н.С.**, Мязин А.Е., Панушкина О.Г., Рубанович А.В., Хаймович Т.И., Снигирева Г.П. Изучение частоты мутаций в мини- и микросателлитных локусах ДНК в клетках членов семей работников атомной промышленности, работавших с тритием и его окисью. Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 6. С. 690-697.
9. Сальникова Л.Е., Акаева Э.А., Елисова Т.В., Кузнецова Г.И., **Кузьмина Н.С.**, Веснина И.Н., Лаптева Н.Ш., Чумаченко А.Г., Романчук В.А., Рубанович А.В. Влияние полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков на частоты спонтанных и индуцированных аббераций хромосом в лимфоцитах человека. Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 5. С. 543-551.
10. **Кузьмина Н.С.**, Ушенкова Л.И., Шагилова Ж.М. Шайхаев Г.О., Михайлов В.Ф., Курбатова Л.А., Мазурик В.К., Рубанович А.В., Засухина Г.Д. Генный полиморфизм у пациентов с синдромом Дауна. Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова, 2009. Т.109. № 4. С. 50-54.
11. Васильева И.М., Шагилова Ж.М., Синельщикова Т.А., Мавлетова Д.А., **Кузьмина Н.С.**, Засухина Г.Д. Защита радиочувствительных клеток человека от воздействия тяжелых металлов антимуtagenами и адаптирующими факторами. Связь с генетическим и белковым полиморфизмом. Генетика. 2009. Т.45. № 6. С. 753-757.
12. Шагилова Ж.М., Ушенкова Л.И., Михайлов В.Ф., Курбатова Л.А., **Кузьмина Н.С.**, Семячкина А.Н., Васильева И.М., Мазурик В.К., Засухина Г.Д. Особенности полиморфизма генов детоксикации, метилентетрагидрофолат – редуктазы (MTHFR) и P53 в радиочувствительных клетках человека. Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50. № 2. С. 128-133.
13. Anna Aghajanyan, **Nina Kuzmina**, Alla Sipyagina, Larisa Baleva, Igor Suskov. Analysis of the genomic instability in offspring of fathers exposed to low doses of ionizing radiation. Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 52. Issue 7. 2011. P. 538-546.
14. **Кузьмина Н.С.**, Мязин А.Е., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Изучение абберантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т.54. № 2. С. 127-139.
15. **Nina S. Kuzmina**, Andrey E.Myazin, Nellya Sh. Lapteva, Alexander B. Rubanovich, The study of hypermethylation in irradiated parents and their children blood leukocytes. Central European Journal of Biology. 2014. V. 9. № 10. P. 941-950.
16. **Nina S. Kuzmina**, Nellya Sh. Lapteva, Alexander B. Rubanovich, Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. Environmental Research. 2016. V. 146. P. 10-17.
17. **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т.57. № 4. С. 341 – 356.
18. **Nina S. Kuzmina**, Nellya Sh. Lapteva, Galina G. Rusinova, Tamara V. Azizova, Natalya S. Vyazovskaya, Alexander B. Rubanovich, Gene hypermethylation in blood leukocytes in

- humans long term after radiation exposure – validation set. *Environmental Pollution*. 2018. V.234. P. 935-942.
19. **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфа-излучений. *Генетика*. 2018. Т. 54. Приложение. С. S22-S26.
 20. **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся внешнему воздействию γ -излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58. № 6. С. 581-588 / **Kuzmina N. S.**, Lapteva N. Sh., Rusinova G. G., Azizova T.V., Vyazovskaya N. S., Rubanovich A. V. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to external gamma radiation. *Biology Bulletin*. 2019. V. 46. № 11. P. 1563-1569.
 21. **Н. С. Кузьмина**. Радиационно-индуцированные нарушения метилирования ДНК: исследования *in vitro* и *in vivo*. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020. Т.60. № 5. С. 481-506.
 22. **Кузьмина Н.С.**, Льюнг Т.М., Рубанович А.В. Изменения метилирования ДНК, индуцированные диоксинами и диоксиноподобными соединениями, как возможный предиктор развития заболеваний. *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1136-1149 / **N. S. Kuzmina**, T. M. Luong, and A. V. Rubanovich. Changes in DNA Methylation Induced by Dioxins and Dioxin-Like Compounds as Potential Predictor of Disease Risk. *Russian Journal of Genetics*. 2020. V. 56. № 10. P. 1180-1192.
 23. **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Ассоциативная связь между гиперметилированием промоторов генов и цитогенетическими показателями у лиц, облученных в результате аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021. Т.61. № 3. С. 227-234.

Главы в книгах и монографиях, статьи в сборниках трудов конференций

1. **Н.С. Кузьмина**, И.И. Сусков, В.А. Шевченко. Феномен геномной нестабильности в организме детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах. Материалы 6-ой Междунар. конф. «Экология человека и природа». Москва-Плес. 5-11 июля 2004. С. 112 – 117.
2. **Н.С. Кузьмина**, И.И. Сусков, В.А. Шевченко. Дисгеномные эффекты в организме детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах. Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. Под ред. Н.Н. Ильинских. Томск. Сибирский госуд. мед. университет. 2004. С. 9-14.
3. **Kuzmina N. S.** The phenomenon of genomic instability in the child,s body exposed to prolonged radiation at small doses and health state. *Papers by Young Scientists. The Second International Conference dedicated to the 105th anniversary of the birth of N.W.Timofeeff-Ressovsky. “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”*, Yerevan, September 8-11, 2005. P. 281-283.
4. Suskov I.I., **Kuzmina N.S.**, Baleva L.S., Sipyagina A.E. The problem of induced genome instability as the basis for elevated morbidity among children exposed by low-rate radiation at small doses. In book: *20 Years After the Chernobyl Accident: Past, Present and Future*. 2007. New-York, Nova Science Publishers, Inc. P. 39-54.
5. Засухина Г.Д., **Кузьмина Н.С.** Генетический полиморфизм в защите клеток человека от мутагенов. В кн. «Молекулярный полиморфизм человека», 2007., М., изд-во РУДН. Т.2, 583-600.

6. Сальникова Л.Е., Фомин Д.К., Елисова Т.В., Акаева Э.А., **Кузьмина Н.С.** и др. Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций для растений, животных и человека. Зависимость цитогенетических и эпидемиологических показателей от генотипов у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Материалы конф. «Динамика генофондов». Москва. 2007. С. 130-132.
7. Шайхаев Г.О., **Кузьмина Н.С.**, Мязин А.Е., Панушкина О.Г., Рубанович А.В., Хаймович Т.И., Снигирева Г.П. и др. Анализ мутаций в мини - и микросателлитных локусах ДНК в группе профессионалов-атомщиков, работавших с тритием и его окисью. Материалы II междунар. конф. «Человек и электромагнитные поля». Саров. 28 мая – 01 июня 2007г. – Саров. 2008. С. 301–314.
8. **Nina S. Kuz'mina**, Victoriya S. Suskova, Anna V. Aghajanyan, Igor I. Suskov. The problem of induced genomic instability in children born from irradiated parents: individual peculiarities of expression, significance of genotype, role in biological resistance of an organism. In book: Seminar of Ecology (ISBN 978-954-397-031-5). 2012, Sofia. P. 93-106.
9. Цыбульская И.С., Сусков И.И., **Кузьмина Н.С.** Генетические аспекты формирования здоровья детей. Глава в монографии И.С. Цыбульской: «Медико-социальные аспекты формирования здоровья детей». Тверь: Тверская городская типография. 2013. 290 с.
10. Рубанович А.В., **Кузьмина Н.С.** Эпигенетические маркеры генотоксического воздействия. Труды конференции «Современные направления в радиобиологии и астробиологии. Молекулярные, генетические, клеточные и тканевые эффекты». Дубна, 28-30 октября 2015. Дубна: ОИЯИ. С. 40-48.
11. **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В.. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся облучению в результате профессиональной деятельности. В сборнике: Современные вопросы радиационной генетики. Материалы российской конференции с международным участием. 2019. С. 76-78.

Тезисы докладов

1. **Н.С. Кузьмина**, И.И. Сусков, В.А. Шевченко. Изучение геномной нестабильности у детей, проживающих на территориях с радиоактивными загрязнениями. Тез. докл. научно-практической конф. «Парадигмы современной радиобиологии». Киев – Чернобыль, 27 сентября – 1 октября, 2004. С. 33.
2. Засухина Г.Д., Васильева И.М., Синельщикова Т.А., Громов С.П., Дурнев А.Д., **Кузьмина Н.С.** Механизмы защиты клеток человека от радиации. Тез. докл. конф. «Фундаментальные науки-медицине», 14-16 декабря 2004 г. С. 235-236.
3. **Кузьмина Н.С.**, Васильева И.М., Синельщикова Т.А., Семячкина А.Н., Шевченко В.А., Засухина Г.Д. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз и нарушения репарации ДНК. Тез. докл. III Международной конференции «Генетические последствия чрезвычайных и радиационных ситуаций», Дубна, 4-7 октября, 2005. М., Издательство РУДН. С.65.
4. Сусков И.И., Агаджанян А.В., **Кузьмина Н.С.**, Иофа Э.Л., Нилова И.Н., Цховребова Л.В., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Цитогенетические исследования детей разных возрастных групп, проживающих на территориях с радионуклидными загрязнениями. Тез. докл. III Международной конференции «Генетические последствия чрезвычайных и радиационных ситуаций», Дубна, 4-7 октября, 2005. М., Издательство РУДН. С. 110.
5. **Kuzmina N. S.** The phenomenon of genomic instability in the child,s body exposed to prolonged radiation at small doses and health state. Abstracts of the Second International Conference dedicated to the 105th anniversary of the birth of N.W.Timofeeff-Ressovsky “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, Yerevan, September 8-11, 2005, P. 128.
6. Suskov I.I., Aghajanyan A.V., **Kuzmina N.S.** et al. The problem of transgeneration genome instability in children born from fathers-liquidators and unirradiated mothers. The II Intern. Conf.”

Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution “ Abst.of the conf. Armenia, Erevan, 8-11 september 2005, p.149.

7. Сусков И.И., **Кузьмина Н.С.**, Сускова В.С., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Проблема дисгеномных эффектов и биологической устойчивости организма у детей подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах. Материалы 3-его международного симпозиума «Хроническое радиационное воздействие: медико-биологические эффекты». Челябинск, 2005. С. 18-19.

8. **Н.С. Кузьмина**, И.И. Сусков, В.А. Шевченко. Экспрессирование геномной нестабильности в организме детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах, и их состояние здоровья. Тез. международной науч. конференции «Современные проблемы генетики». Белоруссия, Минск, 10-12 ноября 2005. С. 306.

9. Засухина Г.Д., **Кузьмина Н.С.**, Васильева И.М., Громов С.П., Ведерников А.И., Семячкина А.Н. Индивидуальная радиочувствительность человека в аспекте генетического полиморфизма. Сижение радиационно-индуцированных эффектов в клетках человека. Тез. докл. конф. «Фундаментальные науки-медицине», Москва. 14-16 декабря 2005 г. С. 194-195.

10. В.А.Шевченко, А.В.Рубанович, А.В.Агаджанян, Э.А.Акаева, Т.В.Елисова, Э.Л.Иофа, Л.Н.Костина, Г.И.Кузнецова, **Н.С.Кузьмина**, А.Е.Мязин, И.Н.Нилова, О.Г.Панушкина, Л.Е.Сальникова, Г.П.Снигирева, И.И.Сусков. Изучение цитогенетических и молекулярно-генетических эффектов у людей, подвергшихся радиационному воздействию, оценка состояния их здоровья и прогноз отдаленных генетических последствий воздействия радиации в ряду поколений. Тез. докл. конф. «Фундаментальные науки-медицине», Москва. 14-16 декабря 2005 г. С. 211-213.

11. **Кузьмина Н.С.**, Засухина Г.Д. Подходы к оценке индивидуальной радиочувствительности человека на основе генетического полиморфизма. Тез. докл. V съезд по радиационным исследованиям. Москва. 10-14 апреля 2006 г. С. 10-11.

12. Сусков И.И., Агаджанян А.В., **Кузьмина Н.С.**, Цховребова Л.В., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Проблема трансгенерационного феномена геномной нестабильности у часто болеющих детей, рожденных от облученных отцов ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Тез. докл. V съезд по радиационным исследованиям. Москва. 10-14 апреля 2006. Т.1. С. 73.

13. Сусков И.И., Агаджанян А.В., **Кузьмина Н.С.**, Елисова Т.В., Иофа Э.Л., Нилова И.Н., Костина Л.Н., Кузнецова Г.И., Акаева Э.А., Рубанович А.В., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Проблема нестабильных геномов в организме больных детей, рожденных и проживающих в условиях хронического действия радиации в малых дозах. Тез. докл. V съезд по радиационным исследованиям. Москва. 10-14 апреля 2006. Т.1. С. 94.

14. Igor I. Suskov, **Nina S. Kuzmina**. Transgeneration genome instability in children born from fathers-liquidators and unirradiated mothers. Proceeding of Intern. Congress “Chernobyl – 20 Years Later”. Berlin. April 3 to 5. 2006. P. 30.

15. **Nina S. Kuzmina**, I.I. Suskov. Genomic instability and health state in children exposed to prolonged radiation by Chernobyl fallout. Proceeding of Intern. Congress “Chernobyl – 20 Years Later”. Berlin. April 3 to 5. 2006. P. 30-31.

16. Рубанович А.В., Агаджанян А.В., Э.А. Акаева, Т.В. Елисова, Э.Л. Иофа, Л.Н. Костина, Г.И. Кузнецова, **Кузьмина Н.С.** и др. Комплексное изучение генетических нарушений в соматических клетках облученных людей и трансгенерационного феномена геномной нестабильности у их потомков. Связь с состоянием здоровья. Тез. докл. конф. «Фундаментальные науки-медицине», Москва. 27-29 ноября 2006. С. 56.

17. Zasukhina G.D., **Kuzmina N.S.** Human cell protection and genetic polymorphism. Abstracts. 35th Annual Meeting of European Radiation Research Society. Kiev. 22nd to 25th august, 2006. P. 26.

18. **Кузьмина Н.С.**, Семячкина А.Н., Засухина Г.Д. Изучение генетического полиморфизма – новый подход к оценке индивидуальных особенностей при наследственных заболеваниях детей. Материалы Российского конгресса “Современные технологии в педиатрии и детской хирургии”. 2006. С. 38.

19. Засухина Г.Д., **Кузьмина Н.С.**, Васильева И.М., Семячкина А.Н. Радиочувствительность человека, ее модификация и генетический полиморфизм. Разработка подходов к увеличению радиоустойчивости. Тез. докл. конф. «Фундаментальные науки-медицине», Москва. 27-29 ноября 2006. С.56.
20. Шайхаев Г.О., **Кузьмина Н.С.**, Мязин А.Е. Панушкина О.Г., Рубанович А.В., Хаймович Т.И., Снигирева Г.П. Анализ мутаций в мини - и микросателлитных локусах ДНК в группе профессионалов-атомщиков, работавших с тритием и его окисью. Тез. докл. II междунар. конф. «Человек и электромагнитные поля». Саров. 28 мая – 01 июня 2007 г. – Саров. 2007.
21. Засухина Г.Д., **Кузьмина Н.С.** Малые дозы ионизирующей радиации как адаптирующий фактор в защите клеток человека от мутагенов. Тез. докл. II Межд. конф. «Человек и электромагнитные поля». Саров, 2007. С. 71-72.
22. Засухина Г.Д., **Кузьмина Н.С.**, Васильева И.М., Шагирова Ж.М. Комплексное изучение генетического полиморфизма как новый подход к защите клеток человека от мутагенов. Материалы конф. «Фундаментальные науки – медицине». Москва. 2007. С. 186-187.
23. Васильева И.М., **Кузьмина Н.С.**, Засухина Г.Д., Синельщикова Т.А. Индивидуальная варибельность защитных механизмов клеток человека от радиации в аспекте генетического полиморфизма. Материалы конф. «Фундаментальные науки – медицине». Москва. 2007. С. 127.
24. А.В. Рубанович, А.В. Агаджанян, Э.А. Акаева, Т.В. Елисова, Э.Л. Иофа, Л.Н. Костина, Г.И. Кузнецова, **Н.С. Кузьмина**, Н.Ш. Лаптева, И.Н. Нилова, Л.Е. Сальникова, И.И. Сусков, В.С. Сускова, Д.К.Фомин. Комплексное изучение трансгенерационных геномно-иммунных нарушений в соматических клетках детей облученных родителей. Связь с генотипическим статусом организма. Материалы конф. «Фундаментальные науки-медицине», Москва. 2007. С. 114.
25. Шагирова Ж.М., Ушенкова Л.И., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К., **Кузьмина Н.С.**, Васильева И.М., Засухина Г.Д. Особенности генетического полиморфизма (P53, гены детоксикации, MTHFR) в радиочувствительных клетках человека. Материалы V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва. 2009. Т.1. С. 527.
26. Шагирова Ж.М., **Кузьмина Н.С.**, Ушенкова Л.И. и др. Генетический полиморфизм в лимфоцитах детей с синдромом Дауна и Элерса-Данло как возможный прогностический критерий для выбора эффективного лечения. Материалы Российского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». Москва. 2009. С. 95.
27. **Kuzmina N. S.** Individual peculiarities of genomic instability expression in children born from irradiated parents and genetic polymorphism. Abstracts of Third International Conference dedicated to N.W.Timofeeff-Ressovsky “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, Alushta. October 9-14. 2010. P. 92.
28. **Кузьмина Н.С.**, Сусков И.И., Сускова В.С., Агаджанян А.В., Балева Л.С., Сипягина А.Е. Полиморфизм генов и индивидуальная варибельность трансгенерационных дисгеномных эффектов у детей облученных родителей. VI съезд по радиационным исследованиям. Москва. 2010. С. 60.
29. Белопольская О.Б., Веснина И.Н., Кузнецова Г.И., **Кузьмина Н.С.**, Лаптева Н.Ш. и др. Оценка селективной значимости и прогноз динамики распространения потенциально опасных аллельных вариантов генов. Материалы конф. «Генофонды и генетическое разнообразие». Москва. 2010. С. 161-163.
30. **Nina Kuzmina**, Andrey Myazin, Nellya Lapteva, Alexandr Rubanovich. The study of hypermethylation in irradiated parents and their children blood leukocytes. Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research. Nis. Serbia. May 27 – 30, 2014. P. 376.
31. **Кузьмина Н.С.**, Мязин А.Е., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Изучение гиперметилирования в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после облучения. VII Съезд по радиационным исследованиям. Москва. 21-24 октября 2014 г. С. 76.
32. **Nina S. Kuz'mina**, Nellya Sh. Lapteva, Alexander V. Rubanovich. Differential significance of age and radiation exposure factor in the hypermethylation of various genes in human blood

leukocytes. Proceedings «Seminar of Ecology - 2015». 23-24 April 2015 – Sofia. Sofia: Union of Bulgarian Scientists. P. 94 - 95.

33. Nina Kuz'mina, Nellya Lapteva, Alexander Rubanovich. Hypermethylation in human blood leukocytes as a result of radiation exposure of the body. Book of Abstracts «Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research». June 8-12 2015. Slovenska Plaza Budva/Montenegro. Nis, Serbia: University of Nis. P. 466.

34. Nina S. Kuzmina, Nellya Sh. Lapteva, Alexander V. Rubanovich. The epigenetic disturbances in human blood leukocytes in remote period after radiation exposure. Book of Abstracts. Fourth International Conference, dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology, and evolution». St. Peterburg, 2-6 June 2015. Dubna: JINR. P. 86.

35. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Изучение гиперметилования промоторов генов в лейкоцитах крови облученных лиц. Материалы конф. "Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений". Дубна, 9-11 ноября 2016. Дубна: ОИЯИ. С. 46-47.