

ДЕЛЕЦИИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ РАБОТНИКОВ ПО «МАЯК», ПОДВЕРГШИХСЯ ПРОЛОНГИРОВАННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЧЕТАННОГО ВНЕШНЕГО γ - И ВНУТРЕННЕГО α -ОБЛУЧЕНИЯ

© 2016 г. Л.В. Малахова, М.Г. Ломаева, М.Л. Захарова*, Е.Н. Кириллова*, С.Н. Соколова*, В.Н. Антипова, В.Г. Безлепкин

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: valery_a@rambler.ru

**Южно-Уральский институт биофизики Федерального медико-биологического агентства,
456780, Озерск Челябинской области, Озерское шоссе, 19*

E-mail: zakharova@subi.su

Поступила в редакцию 11.08.16 г.

Представлены результаты исследования уровня больших делеций в митохондриальной ДНК у работников ПО «Маяк», в процессе профессиональной деятельности подвергавшихся внешнему и сочетанному (внешнему γ - и внутреннему α -) хроническому радиационному воздействию. Использованы образцы ДНК периферической крови, полученные из Радиобиологического репозитория тканей человека ЮУрИБФ, Россия; применен метод ПЦР протяженных фрагментов. При дополнительной радиационной нагрузке за счет инкорпорированного ^{239}Pu (содержание в организме 0,77–4,32 кБк) в крови работников с сочетанным радиационным воздействием по сравнению с лицами, подвергавшимися только внешнему γ -облучению, достоверно в 2,5 раза снижается количество больших делеций в мтДНК. Не установлено достоверных гендерных различий в частоте делеций для лиц близкого возрастного диапазона.

Ключевые слова: большие делеции мтДНК, работники ПО «Маяк», пролонгированное γ -облучение, α -облучение инкорпорированным ^{239}Pu , отдаленный пострadiационный период.

Проблема последствий пролонгированного действия радиации на организм является особенно актуальной в связи с развитием атомной энергетики, ядерных технологий и использованием источников ионизирующих излучений в различных областях деятельности. В связи с этим возрастает комплексная радиационная нагрузка на разные контингенты людей. Например, космонавты при длительных полетах подвергаются постоянному комплексному воздействию космической радиации, представляющей смесь частиц с низкой линейной передачей энергии (ЛПЭ), таких как рентгеновское и γ -излучение, и тяжелых заряженных частиц с высокой ЛПЭ. Пациенты с онкологическими заболеваниями подвергаются терапии с использованием тяжелых ионов, рентгеновского и γ -излучения. Работники предприятий атомной промышленности в период профессиональной деятельности

подвергаются пролонгированному сочетанному воздействию внутреннего α -облучения инкорпорированными радионуклидами и внешнего γ -облучения. Население также может подвергаться воздействию ионизирующих излучений вследствие аварий на предприятиях атомной промышленности и при испытаниях ядерного вооружения, что, в свою очередь, может привести к повышению риска развития тяжелой соматической патологии [1–6]. Для комплексной оценки действия ионизирующих излучений на организм человека необходимо учитывать происходящие изменения как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК (мтДНК). МтДНК существенно отличается от ядерной ДНК [7]. Эти отличия делают митохондриальный геном более чувствительной мишенью для внешних повреждающих агентов, способствуя формированию мутаций в мтДНК с частотой, в 10–50 раз превышающей таковую в соразмерном фрагменте ядерной ДНК [7]. Одним из потенциальных маркеров для оценки уровня генотоксического груза на организм при действии физиче-

Сокращения: ЛПЭ – линейная передача энергии, мтДНК – митохондриальная ДНК, ПК – периферическая кровь, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Таблица 1. Характеристика обследованных групп доноров, созданных из когорты бывших работников ПО «Маяк»

Параметр	Сравниваемые группы			
	Группа А	Группа Б	Группа В	Группа Г
Количество доноров (мужчины и женщины)	15 (7 и 8)	15 (7 и 8)	15 (12 и 3)	15 (11 и 4)
Возрастной диапазон	69–77 лет	66–77 лет	67–78 лет	67–76 лет
СПД γ -облучения, сГр	99,09 \pm 20,00	148,24 \pm 21,82	149,15 \pm 22,36	129,76 \pm 27,62
Содержание ^{239}Pu в организме, кБк	0,14 \pm 0,02 (0,06–0,23)	0,46 \pm 0,04 (0,28–0,74)	2,04 \pm 0,33 (0,77–4,32)	нет

Примечание. СПД – средняя поглощенная доза.

ских и химических агентов многие исследователи рассматривают делеции мтДНК. Формирование делеций регистрируется при действии ионизирующих излучений с низкой ЛПЭ, причем это показано в исследованиях, выполненных не только на клеточных культурах [8–13], но также на уровне целого организма [14–16].

В литературе недостаточно информации о формировании больших делеций в мтДНК клеток тканей человека и животных, подвергшихся воздействию радиации с низкой ЛПЭ на уровне целого организма. При этом данные об образовании протяженных делеций в митохондриальном геноме человека после генотоксического воздействия ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ в научной литературе отсутствуют, хотя такие исследования, с учетом вышесказанного, являются весьма актуальными и полезными для радиобиологии, биомедицины и генотоксикологии.

Целью настоящей работы является исследование влияния инкорпорированного ^{239}Pu на содержание больших делеций в мтДНК цельной периферической крови (ПК) работников ПО «Маяк», в процессе трудовой деятельности подвергавшихся сочетанному воздействию внутреннего α -облучения и пролонгированного внешнего γ -облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованные лица и препараты ДНК. Препараты общей ДНК, выделенной из цельной ПК фенол-хлороформным методом, были получены из Радиобиологического репозитория тканей человека Южно-Уральского института биофизики Федерального медико-биологического Агентства (г. Озерск, Челябинская область) [17].

Работники ПО «Маяк», близкие по возрасту, были разделены на четыре группы (А, Б, В, Г). Доноры ПК из групп А, Б, В (45 человек, мужчины и женщины) имели профессиональный

контакт с аэрозолями преимущественно низко-транспортельных соединений ^{239}Pu и источниками внешнего γ -излучения. Лица из указанных групп различались по содержанию в организме ^{239}Pu (минимальное, среднее и максимальное соответственно) на момент забора крови (табл. 1). Средняя суммарная доза внешнего облучения доноров из групп Б и В была в 1,5 раза выше, чем в группе А. Группу Г составили работники ПО «Маяк», имевшие в течение длительного времени профессиональный контакт только с источниками внешнего γ -излучения. Особенностью пролонгированного воздействия внешней радиации является неравномерность накопления суммарной дозы, обусловленная различной продолжительностью облучения и разной мощностью дозы [17].

Краткая характеристика групп доноров представлена в табл. 1.

Количество ДНК определяли по реакции с красителем PicoGreen согласно протоколу производителя (Molecular Probes, Eugene, США). Регистрацию флуоресценции проводили на приборе Infinite 200 NanoQuant (Tecan Group Ltd., Швейцария).

Полимеразная цепная реакция. Для выявления делеции 4977 п.о. использовали пару праймеров L7901: 5' TGA ACC TAC GAG TAC ACC GA 3' и H13631: 5' GGG GAA GCG AGG TTG ACC TG 3', позволяющих амплифицировать полноразмерный фрагмент мтДНК человека размером 5750 п.о. [18].

Для обнаружения больших делеций других размеров (множественных), была использована пара праймеров L7901 и H16514 5' GTG GGC TAT TTA GGC TTT ATG ACC CTG 3', позволяющая амплифицировать полноразмерный фрагмент мтДНК протяженностью 8640 п.о. [18]. Синтез праймеров был выполнен ЗАО «Синтол» (Россия).

Реакционная смесь (одинаковая для всех пар праймеров) для проведения полимеразной цеп-

ной реакции (ПЦР) в объеме 25 мкл содержала: 100 нг общей ДНК-матрицы; 0,2 мкМ праймеров каждой пары; 67 mM трис-HCl, pH 8,8; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% твин 20; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM каждого дНТФ. Использовали смесь полимераз Taq и Pfu (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 10:1 (1,0 – единица суммарной активности). Реакцию проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Режим амплификации (35 циклов): первичная денатурация ДНК-матриц при 94°C в течение 5 мин; денатурация в циклах при 94°C – 30 с; отжиг и элонгация при 68°C – 8 мин (полноразмерный фрагмент мтДНК протяженностью 8640 п.о.), 5 мин (полноразмерный фрагмент мтДНК протяженностью 5750 п.о.) и 2,5 мин (синтез всех коротких фрагментов на матрицах мтДНК с делециями). Завершающий синтез – 10 мин при 72°C.

Для исключения артефактов, иногда возникающих при проведении ПЦР, были выполнены дополнительные эксперименты – реакции ПЦР со сдвигом праймеров [19]. С этой целью продукты ПЦР, полученные на матрице мтДНК с делециями, были очищены из геля с применением колонок Quantum Prep Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) для дальнейшего проведения амплификации с одним исходным и одним дополнительным праймерами. Если в такой реакции синтезировался фрагмент с теоретически рассчитанным размером, то это подтверждало наличие делеции. Например, для подтверждения наличия делеции размером 4977 п.о. использовали пары праймеров ATR6.2 mtF 8416 [20] и H13631, и в этом случае на фрагменте длиной 773 п.о. амплифицировался продукт размером 258 п.о., а при использовании пары праймеров L7901 и KmtR 8380 – продукт размером 480 п.о. Для множественных делеций были использованы следующие пары праймеров: 1 – Dloop1 mtF16100 [20] и H16514 (синтезировался фрагмент длиной 441 п.о.); 2 – Dloop2 mtF16411 [20] и H16514 (синтезировался фрагмент длиной 130 п.о.); 3 – ATR6.2 mtF8416 [20] и H16514 (синтезировался фрагмент длиной 491 п.о.). В этой серии экспериментов режим реамплификации (35 циклов) был следующий: первичная денатурация ДНК-матриц при 94°C длилась 4 мин; денатурация в циклах при 94°C – 30 с; отжиг при 55°C – 45 с; элонгация при 72°C – 1 мин; заключительная инкубация – 4 мин при 72°C.

Визуализация. Продукты ПЦР во всех случаях разделяли на 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием, визуализировали на УФ-трансиллюминаторе Firstlight (UVP, Inc., США) и фиксировали с помощью гель-документирующей системы Doc-Print (Vilber Lourmat Systems Inc., Франция).

Статистика. Для статистической оценки результатов был использован метод анализа качественных признаков – определение критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе мы сравнивали количество больших делеций в мтДНК ПК в группах обследованных доноров. Делеция размером 4977 п.о., также называемая «общей» («common deletion»), а также большие делеции других размеров («multi deletions») были описаны в работе [18]. Для выявления делеций в образцах ДНК из ПК доноров использовали ПЦР протяженных фрагментов (Long-extended PCR), когда вместе с полноразмерным длинным фрагментом синтезируются укороченные копии на матрицах с делециями, в которых сохранились места для гибридизации праймеров [22]. О наличии общей делеции 4977 п.о. судили по появлению на геле дополнительного фрагмента размером 773 п.о. ($5750 - 773 = 4977$). Присутствие при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР дополнительных фрагментов протяженностью 1204, 1005, 903, 784 и 596 п.о. свидетельствовало о наличии делеций («множественных») протяженностью 7436, 635, 7737, 7856 и 8044 п.о. соответственно.

Для демонстрации выявленных делеций на рис. 1 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР фрагмента мтДНК размером 8640 п.о. Реакцию проводили в режиме укороченного времени элонгации. Образцы ДНК были получены из ПК отдельных индивидуумов из разных групп доноров. Как можно видеть из этих данных, примененные для анализа условия приводят к синтезу на копиях мтДНК с делециями фрагментов 1204, 1005, 784 и 596 п.о. Это свидетельствует о наличии в этих образцах ДНК копий с делециями 7436, 7635, 7856 и 8044 п.о. В образце на дорожке 4 продуктов ПЦР нет. Это указывает на отсутствие у донора в ПК копий мтДНК с множественными делециями.

Каждый продукт ПЦР, полученный на матрице мтДНК с делециями, был проверен с помощью дополнительных экспериментов, описанных в разделе «Материалы и методы». Результаты одного из таких проверочных экспериментов представлены на рис. 2. На продуктах ПЦР, полученных на образцах мтДНК с делециями, с помощью пары праймеров (Dloop1 mtF16100) и (H16514) синтезировали фрагмент размером 441 п.о. Его появление свидетельствует том, что продукты ПЦР размерами 596, 784, 903, 1005 и 1204 п.о., получаемые на исследуемых образцах ДНК из ПК, действительно синтезируются только на матрицах

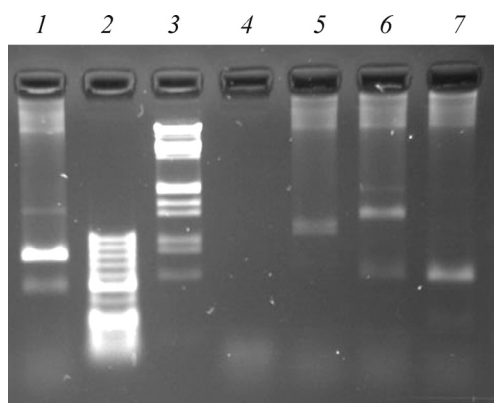


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных на образцах мтДНК периферической крови работников из разных групп доноров. Регистрация множественных делеций. Продукты ПЦР размером 784 п.о. – дорожка 1; 1005 п.о. – дорожка 5; 1204 п.о. – дорожка 6; 596 п.о. – дорожка 7; маркер GeneRuler 50 bp DNA Ladder (от 1031 до 50 п.о.) – дорожка 2; маркер Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker (от 21226 до 564 п.о.) – дорожка 3.

мтДНК с делециями 8044, 7856, 7737, 7635, 7436 п.о. соответственно.

После выполнения ПЦР-анализов были подсчитаны делеции для всех групп доноров, а затем был проведен статистический анализ количества этих делеций путем построения из экспериментальных данных таблиц сопряженности, попарного сравнения групп и определения критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность [21]. Эти результаты обобщены в табл. 2 и 3.

Для используемого статистического метода отличия считаются достоверными, если значение $\chi^2 > 2,706$ (критическое значение для 10% уровня значимости). Предварительно проведенный анализ показал отсутствие достоверных различий в количестве делеций для лиц близкого возраста разного пола ($\chi^2 = 0,671$), поэтому мужчины и женщины при составлении обследуемых групп были объединены (см. табл. 1). Отсутствие влияния пола на формирование делеций в мтДНК также показано в работах [23,24].

Статистически значимые различия по количеству делеции размером 4977 п.о. найдены только при сравнении группы В с группой Г (13,33% и 54,84% соответственно, $\chi^2 = 5,585$). При сравнении доноров групп А–В с донорами группы Г статистически значимых различий по количеству множественных делеций не найдено, но наблюдается тенденция к их снижению в группах А–В с увеличением содержания плутония в организме. (50,00% – 42,11% – 26,67%). Сравнение доноров групп А–В с донорами группы Г показало статистически значимую разницу

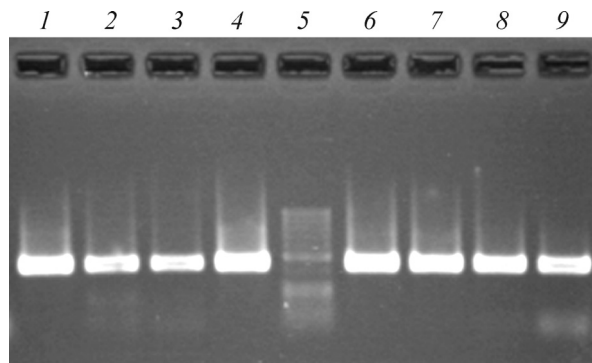


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР на фрагментах мтДНК с множественными делециями. На матрицах размерами 596 п.о. (дорожки 1 и 2); 784 п.о. (дорожки 3 и 4); 903 п.о. (дорожка 6); 1005 п.о. (дорожка 7) и 1204 п.о. (дорожки 8 и 9), синтезированными на образцах ДНК из ПК восьми доноров, амплифицировался фрагмент 441 п.о.; дорожка 5 – маркер GeneRuler 50bp DNA Ladder.

в количестве всех больших делеций только для группы В ($\chi^2 = 7,226$). Из данных табл. 2 можно видеть, что максимум всех делеций в мтДНК регистрируется у доноров группы Г – 51,5%, а минимум всех делеций мы обнаруживаем у доноров с наибольшим содержанием инкорпорированного ^{239}Pu на момент забора крови – в группе В (20,0%).

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о связи количества выявленных делеций в мтДНК ПК работников ПО «Маяк», подвергшихся сочетанному радиационному облучению, с содержанием α -излучающего радиоизотопа в организме.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования показали, что копии мтДНК, содержащие большие делеции, выявляются во всех исследованных группах бывших работников ПО «Маяк». Наибольшее содержание делеций обнаружено у доноров группы Г, подвергавшихся воздействию только внешнего γ -облучения. Можно допустить, что у лиц этой группы количество делеций в мтДНК ПК зависело от двух причин: доказанное накопление делеций в процессе старения [25–27] и накопление делеций вследствие внешнего облучения работников радиацией с низкой ЛПЭ [14–16]. Индукция больших делеций в мтДНК после воздействия ионизирующих излучений с низкой ЛПЭ, таких как рентгеновское и γ -излучение, также показана в работах, выполненных с использованием клеток здоровых людей, пациентов с различными заболеваниями [8–13] и клеток разных тканей облученных грызунов [28,29]. Например, в работе [9] продемонстрировано накопление делеции 4977 п.о. через 72 ч

Таблица 2. Количество делеций в мтДНК периферической крови обследованных доноров–работников ПО «Маяк»

Делеции	Количество делеций в группе, %			
	Группа А	Группа Б	Группа В	Группа Г
4977 п.о.	26,67	26,67	13,33*	54,84
Множественные	50,00	42,11	26,67	48,65
Все делеции	39,39	35,29	20,0*	51,47

Примечание. * – При сравнении количества делеций в группах В и Г найдены статически значимые отличия по критерию χ^2 с поправкой Йетса.

Таблица 3. Значения критерия χ^2 с поправкой Йетса при сравнении количества делеций в мтДНК периферической крови обследованных групп доноров – работников ПО «Маяк»

Делеции	Значения критерия χ^2 в группе		
	Группа А	Группа Б	Группа В
4977 п.о.	2,202	2,202	5,585*
Множественные	–	0,033	1,314
Все делеции	0,866	1,812	7,226*

Примечание. Сравнение производили с показателями в группе Г. * – При сравнении количества делеций в группах В и Г найдены значимые отличия по критерию χ^2 с поправкой Йетса.

после воздействия ионизирующего излучения (^{137}Cs) в дозах 2, 5, 10 и 20 Гр во всех исследованных клеточных линиях человека. Индукцию делеции 4881 п.о. наблюдали в культивируемых клетках НРУ-G через 12 ч после прямого воздействия γ -излучения (^{60}Co) в дозе 0,5 Гр [10]. Рентгеновское излучение при облучении мышей в дозах 2 и 5 Гр индуцирует большие делеции в мтДНК клеток головного мозга и селезенки, выход которых достигает максимума на 8-й и 4-й дни соответственно [28]. После воздействия на мышей линии СЗН/HeJ внешнего γ -облучения в дозе 2 Гр через 12 месяцев в клетках почек и печени обнаруживали увеличение уровня «общей» мышиной делеции [29]. Хотя механизм формирования больших делеций неизвестен, наиболее вероятно образование делеций из-за ошибок репликации [30] и возникновения двунитевых разрывов мтДНК при репарации повреждений [31,32].

При неравномерном внешнем γ -облучении работников ПО «Маяк» период между дозовыми нагрузками на людей может составлять годы, и можно ожидать, что за периоды между воздействиями ионизирующего излучения в клетках костного мозга могли осуществиться репарационные процессы поврежденных молекул мтДНК, служащих матрицами для производства копий с делециями. Можно также предположить, что клетки с индуцированными делециями могли погибнуть в течение какого-то

пострадиационного периода и не дать поколения с перестроенными (делетированными) молекулами мтДНК [33–35]. Возможно, из клеток были элиминированы делетированные копии мтДНК, или разрушены сами митохондрии с делециями [28,36,37]. В нашем случае после ухода обследованных работников с предприятия прошло 18–27 лет и копии мтДНК с делециями, индуцированными ионизирующими излучениями, могли подвергнуться селективной элиминации в процессе обновления стволовых клеток и клеток ПК. ^{239}Pu является долгоживущим (период полураспада 24 тыс. лет) плотноионизирующим α -излучателем с высокой ЛПЭ. По сравнению с ионизирующими излучениями с низкой ЛПЭ (рентгеновское и γ -излучение) α -частицы намного более эффективны в провоцировании различных биологических эффектов в животных клетках, включая геномную нестабильность и индукцию канцерогенеза [1,2,38–44]. По сравнению с рентгеновским и γ -излучением радиация с высокой ЛПЭ индуцирует более сложные окислительные кластерные повреждения ДНК. При этом процесс репарации двунитевых разрывов более затруднен из-за снижения активности ферментов, приводя к увеличению хромосомных aberrаций, трансформации и клеточной гибели [45]. В работе [46] показано, что направленное облучение цитоплазмы эпителиальных клеток человека (линии SAE) α -частицами индуцировало окислительные повреждения и двунитевые разрывы ДНК

в диком типе этих клеток с существенным увеличением аутофагии и образования микроядер. В экспериментах с клетками, лишенными мтДНК, после облучения цитоплазмы α -частицами наблюдали значительно более слабый ответ в тех же самых конечных точках. На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, что основным посредником между облучением цитоплазмы и генотоксическими повреждениями ДНК в животных клетках являются митохондрии [47,48]. В клетке существуют два пути для апоптоза: «внешний» (через посредника рецептора смерти) и «внутренний». Внутренний путь подчеркивает роль митохондрий в регуляции апоптоза [46,47]. Направленное облучение цитоплазмы α -частицами индуцирует расщепление митохондрий. Клетки обнаруживают такие митохондрии и элиминируют их аутофагией [49,50]. Из полученных нами данных (табл. 2) видно, что меньше всего больших делеций в мтДНК ПК мы обнаруживаем у доноров группы В, людей, с максимальным содержанием ^{239}Pu в организме на момент забора крови. В связи с особенностями метаболизма плутония, имеющего длительный период полувыведения из организма, облучение даже при его однократном поступлении, продолжается в течение всей последующей жизни [51]. Такое хроническое облучение α -частицами с высокой ЛПЭ могло индуцировать образование дополнительных критических повреждений к уже имеющимся в геноме клетки и ее органеллах. Это могло привести к активации апоптоза для элиминации поврежденных клеток [47], аутофагии, контролирующей качество избирательной деградации органелл, включая митохондрии (митофагии) [49,50,52–54], и/или гибель клеток, содержащих копии мтДНК с делециями [33]. Сочетанное протекание всех указанных выше процессов, возможно, и привело к снижению в ПК количества клеток и самих митохондрий, содержащих копии мтДНК с делециями.

Таким образом, в данной работе показано, что дополнительное воздействие внутреннего α -излучения инкорпорированным в организме ^{239}Pu в диапазоне доз 0,77–4,32 кБк вызывает статистически значимое снижение количества больших делеций в мтДНК ПК бывших работников ПО «Маяк», подвергавшихся в процессе трудовой деятельности воздействию внешнего γ -излучения, по сравнению с уровнем выявленных больших делеций в мтДНК целевой ПК работников ПО «Маяк», имевших контакт только с источниками внешнего γ -излучения.

Работа выполнена с использованием оборудования Регионального Пушинского Центра коллективного пользования «Структурно-функциональные исследования биосистем» Институ-

та теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории радиационной молекулярной биологии ИТЭБ РАН за помощь и поддержку при проведении экспериментальной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Awa and J. V. Nell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1021 (1986).
2. J. R. Lasutka, Mutat. Res. **350**, 315 (1996)
3. Y. Tatsukawa, E. Nakashima, M. Yamada et al., Radiat. Res. **170**, 269 (2008).
4. А. В. Аклеев, *Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча* («Книга», Челябинск, 2012).
5. В. И. Тельнов, Гигиена и санитария **94** (3), 56 (2015).
6. А. В. Аклеев, В. К. Иванов, Т. Г. Сазыкина и др., Мед. радиология и радиац. безопасность **60** (5), 12 (2015).
7. А. И. Газиев, Радиационная биология. Радиоэкология **53** (2), 117 (2013).
8. N. Kubota, J. I. Hayashi, T. Inada, et al., Radiat. Res. **148**, 395 (1997).
9. S. Prithivirajsingh, M. D. Story, S. A. Bergh, et al., FEBS Lett. **571**, 227 (2004).
10. J. E. Murphy, S. Nugent, C. Seymour, et al., Mutat. Res. **585** (1–2), 127 (2005).
11. X. T. Zhao, J. B. Feng, Y. W. Li, et al., Biomed. Environ. Sci. **25** (5), 533 (2012).
12. E. J. Kim, S. Y. Kim, H. J. Yun, et al., Mutat. Res. **749**, **53** (2012).
13. D. Maguire, S. B. Zhang, and P. Okunieff, Adv. Exp. Med. Biol. **812**, 1 (2014).
14. Q. Wen, Y. Hu, F. Ji, G. Qian, et al., Radiat. Oncol. **6**, 133 (2011).
15. Л. В. Малахова, В. Н. Антипова, Н. А. Гуляева и др., Вопр. онкологии **52** (4), 398 (2006).
16. T. M. Wardell, E. Ferguson, P. F. Chinnery, et al., Mutat. Res. **525**, 19 (2003).
17. Е. Н. Кириллова, С. А. Романов, К. А. Лоффредо и др., Радиационная биология. Радиоэкология **54** (6), 565 (2014).
18. Zhang, A. Baumer, R. J. Maxwell, et al., FEBS Lett. **297**, 34 (1992).
19. W. Sato, M. Tanaka, K. Ohno, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **162** (2), 664 (1989).
20. L. J. Wong, M. H. Liang, H. Kwon, et al., Clin. Chem. **48** (11), 1901 (2002).
21. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика* («Практика», М., 1999).
22. P. Reynier and Y. Malthiery, Biochem. Biophys. Res. Commun. **217** (1), 59 (1995).
23. X. T. Zhao, J. B. Feng, Y. W. Li, et al., Biomed. Environ. Sci. **25** (5), 533 (2012).
24. S. Ye. Zhang, A. A. Sayer, et al., Biochem. Soc. Transactions. **31** (2), 444 (2003).

25. S. D. Taylor, N. G. Ericson, J. N. Burton, et al., *Aging Cell*. **13** (1), 29 (2014).
26. Y. Y. Li, C. Hengstenberg, and B. Maisch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210** (1), 211 (1995).
27. P. S. Lim, Y. M. Cheng, and Y. H. Wei, *Free Rad. Biol. Med.* **29** (5), 454 (2000).
28. В. Н. Антипова, Л. В. Малахова и В. Г. Безлепкин, *Биофизика* **56**, 439 (2011).
29. S. B. Zhang and P. Okunieff, *Adv. Exp. Med. Biol.* **812**, 1 (2014).
30. I. J. Holt, H. E. Lorimer, and H. T. Jacobs, *Cell* **100** (5), 515 (2000).
31. H. Fukui and C. T. Moraes, *Hum. Mol. Genet.* **18** (6), 1028 (2009).
32. K. J. Krishnan, A. K. Reeve, D. C. Samuels, et al., *Nat. Genet.* **40** (3), 275 (2008).
33. L. Wang, Y. Kuwahara, L. Li, et al., *J. Radiat. Biol.* **83** (7), 433 (2007).
34. G. Hughes, M. P. Murphy, and E. C. Ledgerwood, *Biochem. J.* **389** (1), 83 (2005).
35. M. J. Jou, T. I. Peng, H. Y. Wu, et al., *Ann. NY. Acad. Sci.* **1042**, 221 (2005).
36. I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, and J. J. Lemasters, *Arch. Biochem. Biophys.* **462** (2), 245 (2007).
37. D. Mijaljica, M. Prescott, and R. J. Devenish, *Autophagy* **3** (1), 4 (2007).
38. M. Hada, H. Wu, F. A. Cucinotta, *Mutat. Res.* **711**, 187 (2011).
39. S. A. Belinsky, D. M. Klinge, K. C. Liechty, et al., *Carcinogenesis* **25**, 1063 (2004).
40. J. Shou, Y. Zhang, and D. Wu, *Chin. Med. Sci. J.* **11**, 162 (1996).
41. Н. А. Попова, Л. П. Назаренко и С. А. Назаренко, *Генетика человека* **40** (12), 1709 (2004).
42. Н. Д. Окладникова, С. В. Осовец и Т. И. Кудрявцева, *Радиационная биология. Радиоэкология* **49** (4), 407 (2009).
43. В. А. Тимошевский, И. Н. Лебедев, С. А. Васильев и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **50** (6), 672 (2010).
44. Н. В. Сотник, Т. В. Азизова и С. В. Осовец, *Радиационная биология. Радиоэкология* **5** (2), 213 (2011).
45. R. Okayasu, *Int. J. Cancer* **130**, 991 (2012).
46. B. Zhang, M. M. Davidson, and T.K. Hei, *Life Sci. Space Res. (Amst)* **1**, 80 (2014).
47. X. Wang, *Genes Dev.* **15**, 2922 (2001).
48. A. P. West, G. S. Shadel, and S. Ghosh *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389 (2011).
49. B. Zhang, M. M. Davidson, H. Zhou, et al., *Cancer Res.* **73**, 6700 (2013).
50. G. Twig, A. Elorza, A. J. Molina, et al., *EMBO J.* **27**, 433 (2008).
51. Е. К. Василенко, М. Э. Сокольников и др. *Радиация и риск* **24** (3), 51 (2015).
52. J. Lee, S. Giordano, and J. Zhang, *Biochem. J.* **441**, 523 (2012).
53. K. Wang and D.J. Klionsky, *Autophagy* **7**, 297 (2011).
54. J. Goldman, R. Taylor, and Y. Zhang, *Mitochondrion* **10**, 309 (2010).

Mitochondrial DNA Deletion in the Peripheral Blood of Mayak PA Workers Exposed to Long-Term Combined Effects of External γ - and Internal α -Radiation

L.V. Malakhova*, **M.G. Lomaeva***, **M.L. Zakharova****, **E.N. Kirillova****, **S.N. Sokolova****,
V.N. Antipova*, and **V.G. Bezlepkina***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Southern Urals Biophysics Institute, Federal Medicobiological Agency,
Ozyorskoe Shosse 19, Ozyorsk, Chelyabinsk Region, 456780 Russia*

This paper presents the results from the research designed to investigate the level of large deletions in mitochondrial DNA of Mayak PA workers exposed to external and combined (external γ - and internal α -) occupational radiation during the course of their duties. The DNA samples from peripheral blood cells used in this study were obtained from the Radiobiological Human Tissue Repository of the Southern Urals Biophysics Institute, Russia; long-extension PCR was used. When the workers received extra-irradiation due to incorporated ^{239}Pu (Pu body burden 0.77–4.32 kBq) a number of large mtDNA deletions in blood of workers exposed to combined radiation was 2.5 times lower than in the individuals exposed to γ -radiation only. No significant gender-related differences in the number of deletions among the individuals of similar age were found.

Key words: large deletions of mtDNA, Mayak PA workers, prolonged γ -radiation exposure, α -radiation due to incorporated ^{239}Pu , remote postradiation period