

INCREASED MUTATION RATE IN OFFSPRING OF THE CHERNOBYL ACCIDENT LIQUIDATORS

ПОВЫШЕНИЕ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ У ДЕТЕЙ ЛИКВИДАТОРОВ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ КАТАСТРОФЫ

H.Sh. Weinberg¹, A. Korol¹, E. Nevo¹, S. Shapiro², G. Rennert²

¹Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel

²National K.H. Cancer Control Center, Carmel Medical Center and Technion Faculty of Medicine, Haifa 34362, Israel

Г.Ш. Вейнберг¹, А. Корол¹, Е. Нево¹, С. Шапиро², Г. Реннерт²

¹Институт эволюции Хайфского университета, Хайфа 31905, Израиль

²Национальный центр контроля онкологических заболеваний Медицинского центра Кармель и Медицинского факультета Техниона, Хайфа 34362, Израиль

Abstract

Exposure to ionising radiation has long been suspected of adding to mutation load in humans. Although the radiation-induced increase in somatic mutation rate and risk of cancer has been documented in a few studies, little is known about the impact of radiation on mutability in human germ cells. Clean up teams of the Chernobyl accident (liquidators) are among those who received the highest radiation exposures in the accident, hence they represent the most suitable cohort to address this question. Members of fourteen liquidator nuclear families were studied for appearance of new fragments in the DNA fingerprinting patterns in offspring born after exposure to radiation. Inter-SSR and RAPD-PCR markers were employed combined with PAGE and silver staining, resulting in about 3195 amplicons per individual per primer, using a selected set of about 100 PCR primers (75 RAPDs and 27 inter-SSR) out of 400 primers screened. The post-radiation offspring had in total 48 new DNA fragments revealed (38 RAPD and 10 inter-SSR PCR). Two new bands were revealed only in the non exposed group utilizing inter-SSR primers, whereas no bands were revealed using RAPD primers. The discovery of new bands in the offspring of the liquidators using extensive DNA fingerprinting raises the possibility of induced germline mutations in people exposed to so called "low doses". This difference is significant ($P < 0.0003$) for RAPD group.

Keywords: ionising radiation, mutation, liquidators, offsprings of liquidators.

INTRODUCTION

Effects of radiation on somatic cells have been studied on model mammals and humans, primarily from the viewpoint of radiation-induced cancer risk and dose reconstruction (Li I.C. et al., 1983; Sankaranarayanan K., 1993). Some data indicated that parental irradiation can also result in an increased susceptibility of the progeny to promoters of cancer, such as 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Vorobtsova I.E. et al., 1993). Studies on model organisms have shown that ionising radiation increase the rate of germ cell mutations (Baker R.J. et al., 1996; Ichikawa S. et al., 1996). In humans, however, it has not been convincingly demonstrated that exposure to low dose radiation could cause heritable changes in germ cells leading to an increased load of *de novo* mutations in the progeny (but see Dubrova Y.E. et al., 1996). Because of very low mutation rates per locus, enormous sample sizes are needed to address this question when classical genetic methods are employed. Hence, long term studies of children born to the survivors of Hiroshima and Nagasaki bombings have revealed a slight,

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие ионизирующих излучений на соматические клетки млекопитающих и человека изучается главным образом с точки зрения риска развития онкологических заболеваний и реконструкции дозы облучения (Li I.C. et al., 1983; Sankaranarayanan K., 1993). Опубликованные данные свидетельствуют, что облучение родителей может приводить к повышению чувствительности потомства к таким активаторам развития рака, как 12-0-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТФА) (Vorobtsova I.E. et al., 1993). Результаты исследований *in vivo* показали, что ионизирующие излучения повышают частоту мутаций в половых клетках (Baker R.J. et al., 1996; Ichikawa S. et al., 1996). При облучении человека в малых дозах возможность развития наследуемых изменений в половых клетках, приводящих к повышению мутаций *de novo* у потомков, не доказана (но см.: Dubrova Y.E. et al., 1996). Для решения данной проблемы при использовании классических методов генетики необходимо исследование огромных выборок из-за низкой частоты мутаций на локус. При долговременном обследовании детей, родившихся у лиц, переживших атомные бомбардировки в Хиросиме и

but non-significant increase in mutation rate (Neel J.V. et al., 1993).

The radiation exposure following the accident in the Chernobyl nuclear power station in 1986 is generally considered as a low dose exposure (Chernobyl Research, 1986; Dubrova Y.E. et al., 1996; Weinberg H.Sh. et al., 1997). However, certain population groups are assumed to have received higher doses. Leading among these are the people who participated in the clean-up of the sequel of the accident, known as “liquidators”, or rectifiers. About 400–500 holders of “liquidator” certificates are currently resident in Israel. This study was aimed at evaluating possible genetic changes in offspring of the Chernobyl liquidators born after parental exposure.

Utilisation of various multilocus DNA fingerprinting techniques enabled us to detect a higher mutation rate in post radiation offspring of Chernobyl liquidators using a large set of PCR primers and silver staining. This article is a report of the findings in the first 14 families evaluated thus far.

METHODS

Families of the liquidators with two children, of which one was born before and one after the exposure of one of the parents to radiation, were eligible for this study. Blood was drawn from both parents and all available children after signing an informed consent explaining the nature and targets of the study. Blood samples were stored at -80°C until DNA was extracted by the method of S.W.M. John et al. (1991). DNA fingerprinting was carried out using two different PCR methods (1) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams J. et al., 1990) and (2) inter-Simple Sequence Repeats-PCR (SSR-PCR) (Zietkiewicz E. et al., 1994). PCR products were separated by Polyacryl Amide Gel Electrophoresis (PAGE) and silver staining (SS). RAPD-PCR evaluated some 45,888 bands, and inter-SSR PCR some 19,273 bands although a significant portion of the recorded loci might overlap.

We evaluated the frequency of appearance of new amplicons detected in children born after the exposure of the parents but not found in the parents or in the sibs born before the accident. Statistical significance of the revealed difference was calculated by the Chi-square test.

RESULTS

In the 14 analysed liquidator families a total of 38 new bands were discovered by means of RAPD-PCR and 10 new bands by inter-SSR PCR, in the children conceived after the exposure to radiation of at least one of the parents. Using RAPD primers we obtained for all children born after the accident: a total number of amplified bands 45,888. Using analogously inter-SSR primers for children born after the accident gave 19,273 bands.

Нагасаки, выявлено незначительное недостоверное повышение частоты мутаций (Neel J.V. et al., 1993).

Облучение вследствие аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) в 1986 г. рассматривается как облучение в малых дозах (Chernobyl Research, 1986; Dubrova Y.E. et al., 1996; Weinberg H.Sh. et al., 1997). Однако отдельные группы населения были облучены в больших дозах, в основном — лица, принимавшие участие в ликвидации последствий аварии, — ликвидаторы. В настоящее время в Израиле проживают около 400–500 лиц, имеющих статус ликвидаторов. Целью данного исследования является оценка возможных генетических изменений у потомков ликвидаторов, которые родились после облучения родителей.

Проведение большого количества методов мультилокусного ДНК-фингерпринта с использованием большого набора PCR-праймеров с последующим окрашиванием серебром и позволило нам выявить повышение частоты мутаций у потомков ликвидаторов. В данной статье приведены данные обследования членов 14 семей.

МЕТОДЫ

В исследование включены 14 семей ликвидаторов, в составе которых было двое детей, один из них родившийся до, а другой — после облучения одного из родителей. Кровь брали у всех членов семьи после подписания документов, объясняющих характер и цель исследования. Пробы крови хранились при температуре -80°C до выделения ДНК по методу S.W.M. John и соавторов (1991). ДНК-фингерпринтирование проводили с использованием двух различных методов PCR (полимеразная цепная реакция): полиморфизм случайно амплифицированных последовательностей ДНК (RAPD) (Williams J. et al., 1990) и PCR межгенных простых повторяющихся последовательностей ДНК (SSR-PCR) (Zietkiewicz E. et al., 1994). Продукты PCR разделяли при помощи электрофореза на полиакриламидном геле (PAGE) и окрашивали серебром. При помощи RAPD-PCR оценено около 45 888 полос, интер-SSR PCR — около 19 273 полос, однако значительная часть исследуемых локусов могла быть исследована обоими методами.

Мы оценивали частоту появления новых амплимеров, определенных у детей, рожденных после облучения родителей, однако не обнаруживаемых у родителей или у сибсов, рожденных до аварии. Статистическую достоверность выявленных изменений определяли с использованием теста χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 14 анализируемых семьях ликвидаторов было обнаружено 38 новых полос с помощью метода RAPD-PCR и 10 новых полос — интер-SSR PCR у детей, которые были зачаты после облучения как минимум одного из родителей. С использованием RAPD-праймеров (в расчете на всех детей, родившихся после аварии) получено 45 888 амплифицированных полос; интер-SSR-праймеров для детей, родившихся после аварии, — 19 273 полосы.

These results were compared with the genetic fingerprinting of the offspring born to the same parents before they were exposed to radiation. No bands different from the parental ones were detected in these children. The proportion of the new bands that presented in the parents relative to the total number of bands was 0.083% for the RAPD-PCR method and 0.052% for the inter-SSR PCR method (table). We compared the frequency of new bands (not represented in the parents) in children born before and after the parental exposure. The difference in bands between the offspring born before- and after- exposure was statistically significant utilizing RAPD group.

Эти результаты сравнивали с генетическим фингер-принтом потомков, родившихся у тех же родителей до их облучения. У этих детей ни одной полосы, отличавшейся от родительских, выявлено не было. Отношение новых полос, выявленных у родителей, к общему числу полос было 0,083% при применении RAPD-PCR метода и 0,052% — для интер-SSR PCR метода (таблица). Мы сравнили частоту новых полос (не представленных у родителей) у детей, которые родились до и после облучения родителей. Различия полос между потомками, родившимися до и после облучения родителей, обнаружены с помощью метода RAPD-PCR были статистически значимы.

TABLE
PREVALENCE OF GENETIC MUTATIONS IN ALL OFFSPRING BORN AFTER THE ACCIDENT TO CHERNOBYL LIQUIDATORS IN ISRAEL
(BY TWO PCR METHODS)

ТАБЛИЦА
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ У ЛИЦ, РОЖДЕННЫХ В ПОСЛЕАВАРИЙНЫЙ ПЕРИОД У ЛИКВИДАТОРОВ ПОСЛЕДСТВИЙ
АВАРИИ НА ЧАЭС, ЖИВУЩИХ В ИЗРАИЛЕ (ПО ДАННЫМ ДВУХ МЕТОДОВ РСР)

Index	RAPD-PCR		Inter-SSR PCR	
	Experimental	Control	Experimental	Control
Total number of amplimers	45,888	17,670	19,273	7,421
Total number of new bands	38	0	10	2
Proportion of new amplimers compared to "old" bands*	0.083%		0.052%	
Chi-square (χ^2)	14.64		0.74	
Significance	P<0.0003		Non significant	

Note. * — by "old" bands we refer to the bands of the child that appear also in either of the parents.

Примечание. * — к "старым" отнесены полосы, обнаруженные у детей и имеющиеся у родителей.

DISCUSSION

These preliminary findings, currently based on 14 families of liquidators fulfilling the inclusion criteria, are suggestive of a possible genetic effect on the parental germplasm by radiation exposure. The observed effect, if further confirmed on a larger scale controlled investigation, could lead to the suggestion that exposure of humans to low-dose radiation is a cause of germline mutations (see also Jansem R.H. et al., 1995; Dubrova Y.E. et al., 1996). Because of very low per locus mutation rates, enormous sample sizes are needed to address this question when classical genetic methods are employed (Neel J.V. et al., 1993). Hence, the very possibility of detection of these changes in our current study, was conditioned by an extremely large number of genome sites amplified (3195 in total), using the selected set of about 100 PCR primers out of 400 primers screened (Weinberg H.Sh. et al., 1997).

The results presented here demonstrate consistently the appearance of new bands in the children born after the exposure, as compared to their sibs; No new bands appeared in the control families in the child born after 1986 using RAPD group. It will be further important to try to link these changes to the doses to which the corresponding liquidators have been exposed. Given the difficulties in retrospective estimation of radiation-exposure levels it is unclear if the doses reconstructed based

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные предварительные данные, базирующиеся на материале исследования 14 семей ликвидаторов, удовлетворяющих критериям включения в исследование, свидетельствуют о возможном генетическом эффекте облучения родительских половых клеток. Наблюдаемые эффекты, в случае их подтверждения результатами широкомасштабных контролируемых исследований, могут стать еще одним свидетельством того, что облучение человека в малых дозах вызывает мутации в половых клетках (Jensen R.H. et al., 1995; Dubrova Y.E. et al., 1996). В связи с низкой частотой мутации на локус при использовании классических генетических методов необходимо исследовать огромное количество материала (Neel J.V. et al., 1993). В проводимом нами исследовании имелась большая вероятность обнаружения этих изменений, обусловленная использованием большого числа амплифицированных участков генома (3195 в целом), отобранных скрининг-методом 100 (из 400) наборов PCR-праймеров (Weinberg H.Sh. et al., 1997).

Представленные результаты свидетельствуют о появлении новых полос у детей, рожденных после облучения родителей, по сравнению с таковыми у сибсов. Новых полос в контрольной группе семей, дети которых родились после 1986 г., при использовании метода RAPD-PCR не выявлено. В дальнейшем будет важно связать выявленные изменения с дозами облучения ликвидаторов. В настоящее время сложность представляет оценка уровней доз облучения. Неясно, как точно дозы, восстановленные по времени и месту пребывания ликви-

on historical data will accurately provide a dose-response relationship. The multipoint fingerprinting strategy proposed here will allow for more sensitive detection of radiation induced changes across the genome assisting in more objective assessment of radiation risk. Current isolation and direct sequencing of the new bands will allow us to better understand the nature of genetic changes caused by low dose radiation in human germ cells and possibly lead to early detection and prevention of the possible medical consequences of such changes.

A study comprising 16 new liquidators' families is underway at the Institute of Evolution. This work is a continuation of the research conducted so far and is done in collaboration with the group Directed by Prof. O.A. Piatak (Scientific Centre for Radiation Medicine, Kyiv).

REFERENCES

- Li I.C., Fu J., Hung Y.T., Chu E.H.* Estimation of mutation rates in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 1983, 111: 253–262.
- Sankaranarayanan K.* Ionizing radiation, genetic risk estimation and molecular biology: Impact and infences. *Trends in Genetics*, 1993, 9: 79–84.
- Vorobtsova I.E., Aliyakparova L.M., Anisimov V.N.* Promotion of skin tumors by 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two generations of descendants of male mice exposed to x-ray irradiation. *Mutation Research*, 1993; 287: 207–216.
- Baker R. J., Van Den Bussche R.A., Amanda J.W., Lara E.W., Meredith J.H., Erin P.R., Michael H.S., Michael D.L., Ronald K.C.* High levels of genetic change in rodents of Chernobyl. *Nature*, 1996, 380: 707–708.
- Ichikawa S., Nakano A., Kenmochi M.I., Murai M., Takashi E., Yamaguchi A., Watanabe K., Tomiyama K., Yogo A., Yazaki T., Okumura M., Shima N., Satoh M., Yoshimoto M., Xiao L.Z.* Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone ku9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. *Mutation Res.*, 1996, 349: 249–259.
- Dubrova Y. E., Nesterov V. N., Krouchinsky N.G., Ostapenko V.A., Neumann R., Neil L. D., Jeffreys A.J.* Human minisatellite rate after the Chernobyl accident. *Nature*, 1996, 380: 683–686.
- Neel J.V., Satoh C., Myers R.* Report of a Workshop on the application of molecular genetics to the study of mutation in the children of atomic bomb survivors. *Mutation Res.*, 1993, 291: 1–20.
- Chernobyl Research: Radiological Aftermath.* European Commission, ECSC-EC-EAEC, Luxemburg, 1986.
- Weinberg H.Sb., Nevo E., Korol A., Fabima T., Rennert G., Shapiro S.* Molecular changes in the offspring of liquidators who emigrated to Israel from the Chernobyl disaster area. *Environ. Health Perspectives*, 1997, 105: 1479–1481.
- John S.W.M., Weitzner G., Rozen R., Scriver C.R.* A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 408.
- Williams J., Kubelic K., Livak K., Rafalski J., Tingey S.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 6531–6535.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176–183.
- Jensen R.H., Langlois R.G., Bigbee W.L., Grant S.G., Moore D., Pilinskaya M., Vorobtsova I., Plenbanov P.* Elevated frequency of glycophorin A mutations in erythrocytes from Chernobyl accident victims. *Rad. Res.*, 1995, 141: 129–131.

датиров в зоне облучения, будут соответствовать дозо-зависимому эффекту. Предложенная стратегия мультилокусного фингерпринтирования позволит повысить чувствительность определения радиационно индуцированных изменений в геноме, способствуя более объективной оценке степени радиационного риска. Обнаружение новых полос и прямое определение их последовательности позволит всесторонне изучить аспекты генетических изменений половых клеток человека вследствие облучения в малых дозах, и, возможно, приведет к раннему выявлению и предотвращению возможных медицинских последствий таких изменений.

В настоящее время в Институте эволюции в сотрудничестве с группой специалистов, руководимой проф. О.А. Пятаком (Научный центр радиационной медицины, Киев), проводится обследование еще 16 семей ликвидаторов. Эта работа является продолжением данного исследования.