

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco77320>

Оценка начальных проявлений токсического процесса в условиях хронического действия малых субтоксичных доз диоксинов, загрязняющих среду

А.Р. Лавренов^{1,2}, К.Г. Орджоникидзе^{1,3}, В.С. Румаков^{1,2}, А.И. Ким^{2,4}, Н.В. Умнова¹¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация⁴Университет МГУ–ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, Китай

АННОТАЦИЯ

Цель. Изучить состояние генома по показателям активности ретротранспозонов; по уровню транскрипции гена, кодирующего ДНК-метилтрансферазу 1 (*DNMT1*); повреждаемости ДНК у животных из природной популяции рыжей полёвки, обитающей в загрязнённых малыми концентрациями диоксинов окрестностях законсервированной свалки (полигона отходов производства и потребления «Саларьево», г. Москва).

Материал и методы. Активность ретротранспозонов ERV-L, B1 и L1 и уровень транскрипции гена *DNMT1* оценивали методом ПЦР в реальном времени. Стабильность ДНК клеток печени и костного мозга характеризовали методом Comet Assay. Полученные характеристики состояния (устойчивости, реактивности и повреждаемости) генома в ответ на стрессовые факторы среды обитания сравнивали в группах животных из изучаемой и условно-контрольной выборок.

Результаты. В условиях длительного хронического воздействия малых доз диоксинов у полёвок из природной популяции обнаружены эффекты снижения активности ретротранспозонов подклассов B1 и L1 и увеличения уровня экспрессии гена *DNMT1*. Повышенный уровень повреждений ДНК (в среднем до 56% ДНК в хвосте кометы) был выявлен в гепатоцитах при дополнительном к хроническому действию малых субтоксичных доз диоксинов действию зимних факторов среды обитания.

Заключение. Подавление активности ретротранспозонов и повышение экспрессии её эпигенетического регулятора (*DNMT1*) можно рассматривать как адаптивную стратегию к длительному хроническому воздействию малых доз диоксинов, загрязняющих среду. Изменение реактивности и дестабилизация генома свидетельствуют о запуске начальных механизмов формирования токсического процесса. Созданная и апробированная методическая база для его изучения открывает перспективы установления порогового уровня и, как следствие, обоснования показателей для скрининговой оценки локального (территориального) риска здоровью населения путем биомониторинга.

Ключевые слова: диоксины; ДНК-метилтрансфераза; ретротранспозоны; Comet Assay; рыжая полёвка; свалка.

Как цитировать:

Лавренов А.Р., Орджоникидзе К.Г., Румаков В.С., Ким А.И., Умнова Н.В. Оценка начальных проявлений токсического процесса в условиях хронического действия малых субтоксичных доз диоксинов, загрязняющих среду // Экология человека. 2022. Т. 29, № 3. С. 199–208.

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco77320>

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco77320>

Evaluation of the initial manifestations of the toxic process in conditions of chronic action of low subtoxic doses of dioxins polluting the environment

Anton R. Lavrenov^{1,2}, Kristina G. Ordzhonikidze^{1,3}, Vladimir S. Roumak^{1,2}, Alexander I. Kim^{2,4}, Natalia V. Umnova¹

¹A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution of the Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation

²Lomonosov Moscow state university, Moscow, Russian Federation

³Vavilov Institute of general genetics of the Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation

⁴Shenzhen MSU-BIT university, Shenzhen, China

ABSTRACT

AIM: To study the state of the genome by indicators of retrotransposon activity — the gene encoding DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*); DNA damage in animals from the natural population of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) living in the vicinity of a preserved landfill contaminated with low concentrations of dioxins (landfill of production and consumption waste — "Salariyevo", Moscow).

MATERIAL AND METHODS: The activity of ERV-L, B1, and L1 retrotransposons and the transcription level of the *DNMT1* gene were evaluated by real-time PCR. The stability of DNA in liver and bone marrow cells was characterized by the comet assay method. Afterward, the obtained characteristics of the state (stability, reactivity, and damage) of the genome in response to environmental stress factors were compared in groups of animals from the study and conditionally control samples.

RESULTS: The effects of a decrease in the activity of retrotransposons of classes B1 and L1, and an increase in *DNMT1* gene expression level were revealed in voles from the natural population living under the long-term chronic exposure to low doses of dioxins decrease in the activity of retrotransposons of classes B1 and L1, and an increase in the expression level of the *DNMT1* gene were revealed. An increased level of DNA damage (on average up to 56% of the DNA in the tail of the comet) was detected in hepatocytes, with the addition of winter environmental factors to the chronic effect of small subtoxic doses of dioxins.

CONCLUSION: Suppression of retrotransposon activity and increased expression of its epigenetic regulator (*DNMT1*) are regarded as adaptive responses to long-term chronic exposure to low doses of dioxins polluting the environment. The alteration in the reactivity and destabilization of the genome indicates the launch of the initial mechanisms of the toxic process formation. The created and tested methodological base for its study opens up prospects for establishing a threshold level, and as a result, substantiating indicators for screening assessment of local (territorial) risk to public health by biomonitoring.

Keywords: dioxins; DNA methyltransferase; retrotransposons; comet assay; bank vole; landfill.

To cite this article:

Lavrenov AR, Ordzhonikidze KG, Roumak VS, Kim AI, Umnova NV. Evaluation of the initial manifestations of the toxic process in conditions of chronic action of low subtoxic doses of dioxins polluting the environment. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2022;29(3):199–208.

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco77320>

Received: 04.08.2021

Accepted: 14.02.2022

Published: 15.06.2022

ВВЕДЕНИЕ

В больших и малых городах России, где проживает большая часть населения, источники диоксинов встречаются практически повсеместно [1]. Высокий уровень вероятности негативного влияния производимых ими выбросов и сбросов на здоровье и развитие организмов определяет актуальность разработки мероприятий для контроля и охраны экологической безопасности [2].

Опосредованное средой длительное хроническое воздействие на население малых субтоксичных доз (концентраций) диоксинов, которые характеризуются выраженными свержкумулятивными эффектами, может проявляться отдалёнными медико-биологическими последствиями. Начальные и клинические формы проявления этих последствий схожи с малоизученными полигенными заболеваниями [2, 3]. В связи с этим отметим, что биологические механизмы формирования и развития отдалённых последствий в значительной степени определяются каскадными изменениями сигнальных путей, запускаемых системой рецептора ароматических углеводородов (AhR), множеством белков-коактиваторов [4] при участии механизмов эпигенетической регуляции (включая метилирования и деметилирования) промоторов множества генов [5]. Поэтому расширение представлений о состоянии генома имеет большую практическую значимость для разработки биомониторинга запускаемых начальными биологическими и токсическими эффектами реакций биосистем организма.

Для охраны окружающей среды в России и здоровья её населения установлены нормы допустимого поступления диоксинов в организм человека и гигиенические нормативы содержания смесей этих веществ в средах [6]. Между тем обоснованная оценка с помощью данных норм и нормативов малых субтоксичных доз (концентраций) диоксинов, загрязняющих среду, затруднена в связи с пространственной мозаичностью их содержания в окружающей среде и тканях человека на подлежащих контролю территориях, индивидуальными различиями в чувствительности и/или резистентности, а также активным влиянием на проявления токсических свойств многих внешних и временных факторов экспозиции [3, 7]. Большую часть этих ограничений позволяет учитывать биомониторинг [8].

Наилучшие условия для биомониторинга путём выявления начальных проявлений токсических эффектов диоксинов предоставляет молекулярная токсикология, так как это направление призвано изучать закономерности взаимодействия токсических химических веществ с живыми организмами на начальном уровне формирования токсического процесса (в первую очередь следует говорить о молекулярном и клеточном уровнях) [6]. Методические возможности молекулярной токсикологии могут способствовать созданию условий для своевременной оценки риска здоровью населения при воздействии выбросов

диоксинов, загрязняющих среду. Всё это в полной мере можно отнести к исследованиям ретротранспозонов во взаимосвязи с регуляторами их активности и проявлениями в виде повреждений ДНК.

Ретротранспозоны, или мобильные генетические элементы, — неперенный компонент ядерной ДНК живого организма [9]. Их ключевыми представителями стали три класса: с длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозоны); короткие диспергированные повторы (SINE — short interspersed repeated sequences); длинные диспергированные повторы (LINE — long interspersed repeated sequences) [10, 11]. Наиболее известными подклассами этих трёх классов являются ERV-L, B1 и L1 соответственно. В благоприятных для жизни условиях ретротранспозоны малоактивны, так как подавляются множеством эпигенетических механизмов, например работой метилтрансфераз [9]. При воздействии на организм многих стрессовых факторов активность ретротранспозонов возрастает, что проявляется ростом уровня их обратной транскрипции и активизацией процессов перемещения внутри генома по типу «копирование и вставка».

Взаимосвязи между активностью ретротранспозонов, утратой геномом присущей ему стабильности и патогенезом многих полигенных заболеваний уже отмечены и активно изучаются [9]. В отношении длительного хронического воздействия на организм малых субтоксичных доз диоксинов, загрязняющих среду, такие данные практически отсутствуют. Необходимость их получения определила цель настоящей работы.

Цель исследования. Изучить состояние генома по показателям активности ретротранспозонов; уровня транскрипции гена, кодирующего ДНК-метилтрансферазу 1 (*DNMT1*); повреждаемости ДНК у животных из природной популяции рыжей полёвки, обитающей в загрязнённых малыми концентрациями диоксинов окрестностях законсервированной свалки (полигона отходов производства и потребления «Саларьево», г. Москва).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали загрязнённые диоксинами ткани животных из природной популяции рыжей полёвки (*Clethrionomys glareolus*), обитающей на сельтебных территориях в окрестностях стационарного источника выбросов и сбросов этих веществ — законсервированной свалки (полигона твёрдых отходов производства и потребления «Саларьево», г. Москва, 55.417925, 37.289854). Четырёхлетний мониторинг (в 2016–2019 гг.) содержания смесей диоксинов в тканях исследуемых животных показал достаточно высокий и стабильный во времени уровень их присутствия. Средние значения общей токсичности, т.е. суммарные величины WHO-TEQ₀₅ в пересчёте на 2,3,7,8-ТХДД (2,3,7,8-тетрахлородибензодиоксин), составляли 3,7±4,5 пг/г липидов. Статистически значимых различий между самками и самцами не выявлено.

Отлов и обследование животных выполнены в 2018–2019 гг. Отметим, что этот вид довольно часто используют в качестве модельного объекта в экотоксикологии [12]. Наши предыдущие исследования (отлов 2016–2017 гг.) [13] показали перспективы использования рыжих полёвок при начальной оценке риска для человека малых субтоксичных доз диоксинов, загрязняющих среду. Условно-контрольная выборка рыжей полёвки представлена потомками популяции, обитавшей до 2011 года на территории Центрально-Лесного заповедника в Тверской области. В настоящее время эта популяция поддерживается сотрудниками научно-экспериментальной базы Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук «Черноголовка» путём непрерывного размножения в условиях вивария. С помощью контрольного измерения содержания диоксинов в тканях животных, представляющих эту выборку, показан низкий уровень загрязнения — $0,26 \pm 0,04$ пг/г липидов.

Общий объём обследованных выборок составил 53 особи (табл. 1).

Эвтаназию экспонированных и неэкспонированных животных проводили путём шейной дислокации после трёхдневного содержания в лаборатории, что исключало стрессовые реакции в ответ на изъятие из привычных условий обитания. Метод эвтаназии соответствовал требованиям ст. 6 и Приложения IV Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей. Пробы печени и костного мозга отбирали сразу после эвтаназии. Ретротранспозоны анализировали в печени, кометы — в печени и костном мозге.

Все последующие генетические анализы тканей выполняли согласно стандартным протоколам по методикам, используемым при биомониторинге и описанным ниже.

Протокол анализа ретротранспозонов предусматривал идентификацию подклассов ERV-L, B1 и L1 в геномной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и изучение активности ретротранспозонов по комплементарной ДНК (кДНК), полученной с их транскриптов. Одновременно определяли уровень транскрипции гена метилтрансферазы *DNMT1*, поскольку метилирование

является одним из основных способов подавления транскрипции ретротранспозонов геномом [9].

Выделение тотальной РНК и геномной ДНК проводили согласно протоколу набора ExtractRNA («Евроген», Россия). Пробы РНК обрабатывались ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в течение одного часа по протоколу фирмы-производителя. кДНК синтезировали с использованием случайного праймера с помощью набора MMLV RT kit согласно протоколу производителя («Евроген», Россия).

Выбор праймеров для ПЦР включал анализ выравнивания известных консервативных последовательностей ретротранспозонов ERV-L (приложение 1), B1 (<http://sines.eimb.ru/>), L1 и последовательностей *DNMT1* (приложение 2); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> [10, 11, 14]. β -актин использовали в качестве референсного гена для оценки уровня транскрипции. С целью нормирования числа ДНК-копий ретротранспозонов применяли однокопийный ген *glucagon (GCG)*. ПЦР проводили согласно протоколу набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Схема цикла ПЦР: плавление — 30 с при 95 °С, отжиг праймеров — от 30 с до 1 мин при 51–55 °С в зависимости от температуры плавления праймеров и синтез в течение 1 мин при 72 °С.

В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК и кДНК. Результаты ПЦР обрабатывали в программе Bio-Rad CFX Manager v. 1.6.541.1028 (Bio-Rad, США).

Последовательности подобранных праймеров:

- Ervpol nF 5'-AGAATGACAGTTGAYTATYGA-3'
- Ervpol nR 5'-ATCAATATAGTGNACCARTGTG-3'
- Ervpolmd-R 5'-AATTGCTTCTGGTGGTCTTAT-3'
- Ervpolmd-F5'-TCCATAAGGACCACCAGAAG-3'
- b1F 5'-ACGCCTTAAATCCCAGCACT-3'
- b1R 5'-TTTCGAGACAGGGTTTCTCTG-3'
- l1F 5'-CTCAGAAGATGGAAGATCTCCCA-3'
- l1R5'-GATGGGGATTGCATTGAATCTGT-3'
- dnmrtF5'-AGTGACGAGGAAGCTGTGGT-3'
- dnmrtR5'-AAGGAAGTAGAAGCGGTCAGG-3'
- β -actin F 5'-GCTCTTTCCAGCCTTCTT-3'
- β -actin R 5'-GAGCCAGAGCAGTGATCTCC-3'
- GLCGN-F 5'-AACATTGCCAAACGTATGATG-3'
- GLCGN-R 5'-GCCTTCTCGGCCTTCA-3'

Таблица 1. Общая характеристика исследованного биоматериала

Table 1. General characteristics of the examined biomaterial

Обозначение выборок / Designation of samples	Условное обозначение / Conditional designation	Исследуемые показатели / Studied indicators	Количество животных / Number of animals	
			самцы / males	самки / females
Экспонированные животные	Sv-BV	ДНК/РНК-анализ	12	6
		ДНК-кометы	5	3
Условно-контрольные	Ch-BV	ДНК/РНК-анализ	10	8
		ДНК-кометы	6	3

Анализ повреждений ДНК методом Comet Assay (гель-электрофорез единичных клеток) проводили в соответствии с рекомендациями OECD Guidelines for the testing of chemicals (2016) [15] и рекомендациями по анализу щелочных комет *in vivo* [16]. Слайды анализировали под микроскопом AxioPlan 2 Imaging (Carl Zeiss, Германия), оснащённым камерой CV-M4+CL (JAI, Япония) и программным обеспечением Comet Imager 2.0 (MetaSystems Hard & Software GmbH, Германия). В качестве показателя повреждённости ДНК в соответствии с рекомендациями OECD 489 использовали процентное содержание ДНК в хвосте кометы (ДНК, %), отражающее относительное количество фрагментов ДНК, мигрирующих к аноду при электрофорезе. От каждого животного анализировали не менее 100 клеток печени и костного мозга на процент ДНК в хвосте кометы и подсчитывали медиану по группе. Согласно рекомендациям OECD 489, медиану процента ДНК в хвосте комет определяли для каждого животного (не менее 100 клеток на животное, полученных с двух слайдов), после чего подсчитывали медиану по группе.

Статистическую обработку данных, полученных методом Comet Assay, а также методом ПЦР в реальном времени, проводили с применением непараметрического теста Манна–Уитни в программе SPSS Statistics, v. 25 и JASP, v. 0.13 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В выборке экспонированных (Sv-BV) и условно контрольных полёвок (Ch-BV) геномная ДНК содержала все изучаемые нами ретротранспозоны — ERV-L, B1 и L1. Количественных различий между выборками по показателю «количество копий» ретротранспозонов на геном не выявлено.

Транскрипция подкласса ERV-L в выборках экспонированных и условно-контрольных полёвок отсутствовала. Уровень транскрипции подклассов B1 и L1 у экспонированных особей был статистически значимо ниже такового у неэкспонированных ($p=0,004$ и $p=0,002$ соответственно) (рис. 1, *a*, *b*). Этому снижению сопутствовало статистически значимое повышение транскрипции гена *DNMT1* ($p=0,002$), участвующего в механизмах метилирования ДНК (рис. 1, *c*). Значимого влияния гендерных различий на уровень транскрипции подклассов B1 и L1 в выборках экспонированных и условно-контрольных животных не установлено. Корреляции этих изменений с показателями массы тела, роста и другими морфометрическими параметрами животных не выявлено.

Методом Comet Assay определили, что у экспонированных животных уровень встречаемости гепатоцитов с повреждениями ДНК был ниже, чем у контрольной выборки, т.е. $2,06\pm 0,28\%$ — для Sv-BV и $5,66\pm 0,89\%$ — для Ch-BV ($p=0,05$). Для клеток костного мозга статистически значимых различий не выявлено ($1,29\pm 0,35\%$ — в выборке Sv-BV и $2,55\pm 0,38\%$ — в выборке Ch-BV).

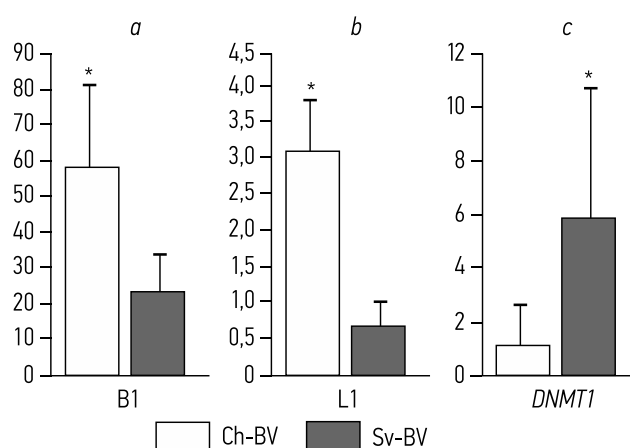


Рис. 1. Уровни транскрипции ретротранспозонов B1 (SINE) (*a*) и L1 (LINE-1) (*b*), а также гена *DNMT1* (*c*), рассчитанной методом Δ Ct с нормализацией на бета-актин. На гистограммах отображены средние значения показателей. Планки погрешностей отражают максимальные и минимальные значения. Ch-BV — условно-контрольная линия из вивария «Черноголовка», Sv-BV — линия, отобранная с экспонированной территории. * статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Fig. 1. Relative levels of retrotransposons transcription — B1 SINE (*a*) and LINE-1 (*b*), and *DNMT1* gene transcription (*c*) calculated by the Δ Ct method with normalization to beta-actin. The average values are shown on the histograms. Error bars represent maximum and minimum values. Ch-BV — conditionally control strain from the “Chernogolovka” vivarium, Sv-BV — voles trapped on the exposed territory near “Salariyevo” landfill. * — significant differences at $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что обусловленное средой длительное хроническое воздействие на организм рыжей полёвки малых субтоксичных доз (концентраций) выбросов диоксинов, производимых законсервированной свалкой отходов производства и потребления, проявилось уменьшением активности ретротранспозонов L1 и B1, повышенным уровнем экспрессии гена *DNMT1*, отсутствием в клетках костного мозга повреждений ДНК и сниженным уровнем встречаемости гепатоцитов с такими повреждениями.

При оценке этого результата важно учитывать, что за период эксплуатации полигона (больше 50 лет) в изучаемой популяции сменилось более 100 поколений, накопивших не только диоксины и другие загрязнители, но и делеционные и/или инсерционные мутации, которые вместе с диоксинами длительное время передавались по нисходящим поколениям, превращаясь в дополнительные факторы риска. При таком множестве факторов экспозиции добиться условий для чёткой идентификации эффектов токсического действия диоксинов крайне сложно, а подчас практически невозможно. В связи с этим стали применять интегральные показатели, фиксирующие изменения, которые часто возникают у экспонированных животных в условиях дополнительных экстремальных нагрузок и отражают начальные проявления

механизмов адаптации и дезадаптации биологических систем [17].

Экстремальная роль зимнего сезона года для полёвок как цикломорфных млекопитающих твёрдо доказана [18]. Мы дополнительно проанализировали вероятные изменения гепатоцитов и клеток костного мозга по показателям встречаемости повреждений ДНК в выборке переживших зиму половозрелых полёвок. Животных из выборки Sv-BV ($n=9$) отловили строго на тех же участках ранней весной сразу после схода снежного покрова в последующий за годом отлова год и обозначили как выборку Sv-BV(Spr). У этих полёвок уровень встречаемости гепатоцитов с повреждениями ДНК оказался очень высоким и составил $55,29 \pm 9,53\%$ против $5,66 \pm 0,80\%$ в условно-контрольной выборке (Ch-BV) и против $2,06 \pm 0,28\%$ — у экспонированных животных (Sv-BV) (рис. 2).

В аспекте перспектив характеристики токсического процесса в виде клинически значимых форм критериев

для оценки этого результата не создано. Между тем эффект высокого уровня нестабильности ДНК в гепатоцитах можно оценить как проявление изменённой реактивности клеток. Косвенное отношение к оценке и трактовке этого результата имеют установленные нами ранее взаимосвязи между показателями сниженной у человека реактивности системы микросомального окисления в печени и лимфоцитах, дестабилизации лимфоцитарной ДНК и проявлениями так называемой диоксиновой патологии. Её характеризуют многие излечимые и практически неизлечимые формы потерь здоровья и нарушения развития, возникающие у жителей загрязнённых диоксинами территорий Вьетнама, которые были обследованы нами в связи с применением армией США диоксиносодержащей рецептуры «Оранжевый агент» [2, 3, 17].

Встречаемость в костном мозге полёвок клеток с повреждениями ДНК во всех рассмотренных нами выборках оказалась хорошо сопоставимой и не превышала 3%.

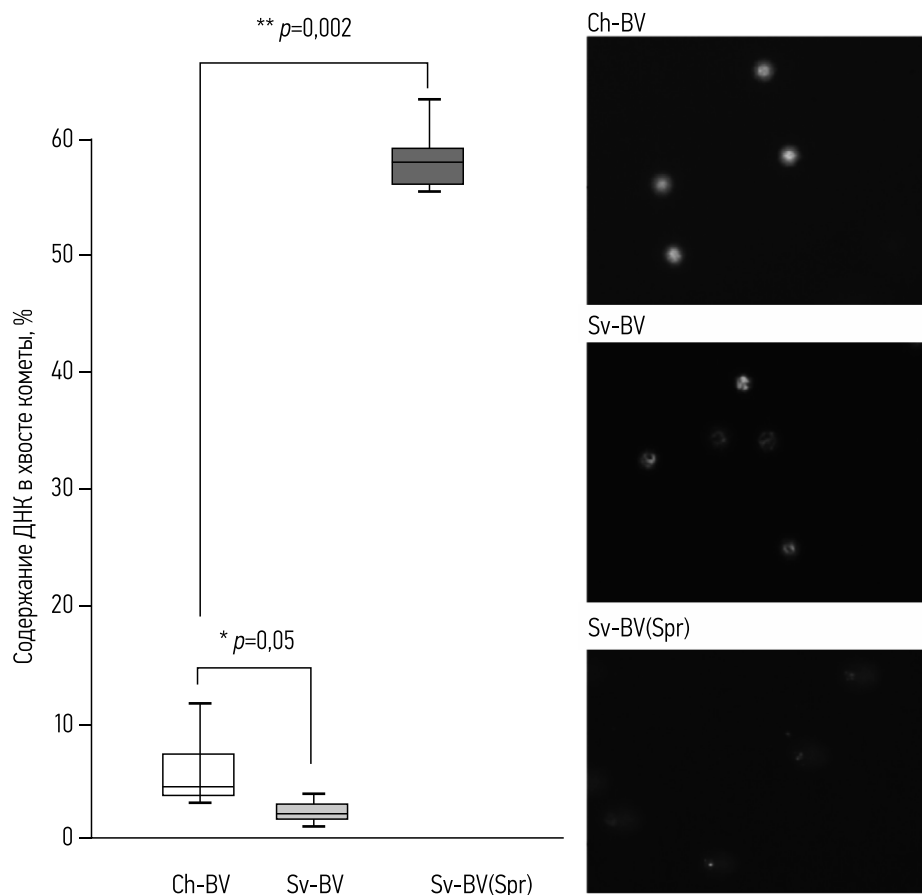


Рис. 2. Процентное содержание ДНК в хвосте кометы в клетках печени рыжей полёвки. Данные представлены в виде диаграммы линейных отрезков, отражающих величины медиан для исследуемых выборок животных с 25% и 75% (цветные прямоугольники) минимальными и максимальными значениями, выбросы (звезды). Sv-BV — экспонированные животные, обследованные в осенний период; Sv-BV(Spr) — экспонированные животные, обследованные в весенний период; Ch-BV — контрольная группа. * $p=0,05$ — статистически значимые отличия от контроля; ** $p=0,002$ — между экспериментальными группами (непараметрический U-критерий Манна–Уитни).

Fig. 2. DNA damage (% DNA in the tail) in liver cells in the bank voles (*Clethrionomys glareolus*) groups. The data is represented as a boxplot for medians for investigated groups of animals with 25% and 75% (“boxes”), minimum and maximum values excluding outliers (stars). Sv-BV — exposed animals, caught in autumn; Sv-BV(Spr) — exposed animals, caught in spring; Ch-BV — control group. * $p=0,05$ — significant differences from the control; ** $p=0,002$ — or between experimental groups (non-parametrical Mann–Whitney U-test).

Среди выборки Sv-BV их процентная частота составила $2,55 \pm 0,38$; среди выборки Sv-BV(Spr) — $1,66 \pm 0,50$ и Ch-BV — $1,29 \pm 0,35\%$. Различия в реакциях со стороны гепатоцитов и клеток костного мозга мы связываем с особенностями условий экспозиции. Известно, что ткани печени в отличие от костного мозга более активно накапливают диоксины [19]. При этом продолжительность жизни дифференцированных гепатоцитов исключительно велика, тогда как костный мозг характеризуется высокой способностью к регенерации [20] и, как следствие, сравнительно непродолжительным периодом взаимодействия зрелых клеток с накопленными диоксинами. Более того, невысокий уровень повреждённых гепатоцитов у животных осеннего отлова может быть связан с повышенным уровнем апоптоза повреждённых клеток, что было нами показано ранее для молодого поколения вьетнамских крестьян [3].

На основании собранных данных появилась возможность оценки использованного в работе протокола исследований для поиска показателей биомониторинга со стороны реакций внутриклеточных структур.

Зарегистрированные нами эффекты повышения уровня транскрипции *DNMT1* и снижения активности ретротранспозонов в полной мере отражают известные представления о регуляции их активности путём метилирования ДНК [9]. В ряде исследований на лабораторных животных и культурах тканей [5, 21] была продемонстрирована индукция экспрессии метилтрансфераз различными дозами ТХДД, что приводило к изменениям уровня метилирования ДНК. Поэтому наблюдаемую нами пониженную активность ретротранспозонов B1 и L1 в выборке экспонированных животных (Sv-BV) мы рассматриваем в аспекте общих механизмов формирования и развития защитных реакций, направленных на активное подавление транспозиции ретротранспозонов и предотвращение дестабилизации генома. Отсутствие подобного эффекта со стороны подкласса ERV-L у экспонированных и неэкспонированных особей мы связываем с тем, что активность этих ретротранспозонов у полёвок очень низкая и, как следствие, выявить её изменения с помощью использованных в работе методов оказалось практически невозможным.

Некоторые лабораторные эксперименты [14, 22] показывают, что диоксины могут стимулировать активность ретротранспозонов и гипометилирование ДНК. Однако лабораторные исследования не учитывают долговременный эффект сверхмалых доз стойких органических загрязнителей на организм, как и адаптивные механизмы, которые передаются из поколения в поколение среди животных, подвергающихся хроническому воздействию химических стрессовых факторов. О негативных последствиях чрезмерной активности ретротранспозонов известно давно [9], но стоит отметить, что и чрезмерное подавление их транскрипции, и гиперметилирование ДНК могут негативно сказываться на жизнеспособности

организма. Так, повышенная активность *DNMT1* и метилирование сайтов транспозонов могут распространяться на соседние гены [14]. Гиперметилирование некоторых генов-супрессоров опухолей приводит к соматическим патологиям [23]. Известно также, что нормальная активность ретротранспозонов важна на ранних стадиях развития млекопитающих [9].

Мы предполагаем, что предотвращение транспозиции ретротранспозонов путём гиперметилирования ДНК — наиболее оптимальная стратегия генома для развития адаптации к экотоксикантам и другим стрессовым факторам окружающей среды. Для более полного понимания происходящих изменений при стрессовом воздействии на организм (что имеет большое практическое значение для биомониторинга) протоколы дальнейших исследований должны быть расширены методами, позволяющими изучать активность ретротранспозонов и связанных с ними эпигенетических процессов (например, изменения уровня экспрессии метилтрансфераз *DNMT3a* и *DNMT3b*, а также статуса метилирования геномной ДНК).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результат анализа данных, отражающих состояние генома печени животных из природной популяции рыжей полёвки, обитающей на загрязнённых малыми субтоксичными концентрациями диоксинов территориях, стал основанием для заключения о запуске начальных механизмов формирования токсического процесса. Полученные нами характеристики таких механизмов не только расширили представления о токсичности этих веществ (что имеет большое практическое значение для установления порогового уровня), но и позволили рекомендовать уже сейчас расширять с их помощью перечень мероприятий скрининговой оценки риска для здоровья населения методами биомониторинга. Особенность популяций рыжей полёвки — длительное проживание на строго определённых, небольших по площади территориях и, соответственно, активное поглощение местных пищевых продуктов, загрязнённых выбросами диоксинов. Следовательно, концентрации диоксинов в тканях этих животных (внутренняя доза) во взаимосвязи с проявлениями начальных токсических эффектов наилучшим образом отражают общие закономерности хемобиокинетики и токсикодинамики диоксинов в условиях максимально жёсткой экспозиции, приуроченной к строго определённой территории. Человек в силу своего образа жизни поглощает эти вещества в существенно меньших количествах. В связи с этим оценка токсичности накопленных полёвками доз диоксинов будет способствовать решению задач по предупреждению риска за счёт формирования научно обоснованного представления о возможной биодоступности для человека этих веществ в ближайшей перспективе.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: А.Р. Лавренов — подготовка исследования, получение и анализ данных, подготовка первого варианта статьи; К.Г. Ордзжоникидзе — дизайн исследования, получение и анализ данных; В.С. Румак — разработка концепции эксперимента, подготовка первого варианта статьи; А.И. Ким — разработка первого варианта статьи; Н.В. Умнова — разработка дизайна и концепции эксперимента, редактирование вариантов статьи, утверждение окончательного варианта рукописи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность научному сотруднику Лаборатории поведения и поведенческой экологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (Россия), к.б.н. Осиповой О.В. за предоставление условно-контрольной линии из коллекции животных ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих»

научно-экспериментальной базы «Черноголовка» Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук.

This research was performed according to the Development program of the Interdisciplinary scientific and educational school of M.V. Lomonosov Moscow state university «Future planet and global environmental change».

Author contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). The greatest contribution is distributed as follows: Anton R. Lavrenov — research preparation, data acquisition and analysis, preparation of the first version of the article; Kristina G. Ordzhonikidze — research design, data acquisition and analysis; Vladimir S. Roumak — development of the concept of the experiment, preparation of the first version of the article; Alexander I. Kim — development of the first version of the article; Natalya V. Umnova — development of the design and concept of the experiment, editing of the versions of the article; approval of the final version of the manuscript.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the researcher of the Laboratory of behavior and behavioral ecology of the A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution of the Russian academy of science (Russia), Ph.D., Osipova OV for providing a conditional control line from the collection of animals from the Joint usage center's «Collection of live mammals».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розанов В.Н., Трегер Ю.А. Оценка выбросов диоксинов основных источников в РФ // Экология и промышленность в России. 2011. № 2. С. 32–35.
2. Софронов Г.А., Бочков Н.П., Умнова Н.В., и др. Эколого-генетические проявления диоксиновой патологии // Медицинский академический журнал. 2006. Т. 6, № 1. С. 163–174.
3. Sycheva L.P., Umnova N.V., Kovalenko M.A., et al. Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of Agent Orange application in Vietnam // Chemosphere. 2016. № 144. P. 1415–1420. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.009
4. Prokopec S.D., Houlahan K.E., Sun R.X., et al. Compendium of TCDD-mediated transcriptomic response datasets in mammalian model systems // BMC Genomics. 2017. Vol. 18, N 1. P. 78. doi: 10.1186/s12864-016-3446-z
5. Patrizi B., Cumis M.S. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms // Int J Mol Sci. 2018. Vol. 19, N 12. P. 4101. doi: 10.3390/ijms19124101
6. Софронов Г.А., Рембовский В.Р., Радиков А.С., Могиленкова Л.А. Современные взгляды на механизмы токсического действия диоксинов и их санитарно-гигиеническое нормирование // Медицинский академический журнал. 2019. Т. 19, № 1. С. 17–28.
7. Агапкина Г.И., Ефименко Е.С., Бродский Е.С., и др. Полихлорированные дибензо-п-диоксины и дибензофураны в почвах г. Москвы // Вестник московского университета. Серия 17, почвоведение. 2010. Т. 65. № 3. С. 16–20. doi: 10.3103/s0147687410030038
8. Weber R., Herold C., Hollert H., et al. Reviewing the relevance of dioxin and PCB sources for food from animal origin and the need for their inventory, control and management // Environ Sci Eur. 2018. Vol. 30. N 1. P. 42. doi: 10.1186/s12302-018-0166-9
9. Goodier J.L. Restricting retrotransposons: a review // Mob DNA. 2016. Vol. 7. P. 16. doi: 10.1186/s13100-016-0070-z
10. Sookdeo A., Hepp C.M., McClure M.A., Boissinot S. Revisiting the evolution of mouse LINE-1 in the genomic era // Mob DNA. 2013. Vol. 4, N 1. P. 3. doi: 10.1186/1759-8753-4-3
11. Veniaminova N.A., Vassetzky N.S., Kramerov D.A. B1 SINEs in different rodent families // Genomics. 2007. Vol. 89, N 6. P. 678–686. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.02.007
12. Безель В.С., Мухачева С.В. Трофические уровни мелких млекопитающих: мультиэлементный состав и токсическая нагрузка // Поволжский экологический журнал. 2012. №1. С. 3–13.
13. Румак В.С., Умнова Н.В., Левенкова Е.С., и др. Диоксины в среде и организме животных вблизи полигона отходов производства и потребления: к методологии риска для здоровья населения // Экология человека. 2017. Т. 24. № 10. С. 9–15. doi: 10.33396/1728-0869-2017-10-9-15

14. Carnell A.N., Goodman J.I. The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity // *Toxicol Sci.* 2003. Vol. 75, N 2. P. 229–235. doi: 10.1093/toxsci/kfg138
15. OECDilibrary [Internet]. Test No. 489: in vivo mammalian alkaline comet assay, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4, Paris: OECD Publishing, 2016.
16. Gajski G., Žegura B., Ladeira C., et al. The comet assay in animal models: from bugs to whales (part 2 vertebrates) // *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2019. Vol. 781. P. 130–164. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.04.002
17. Roumak V.S., Umnova N.V., Poznyakov S.P., An N.Q., Sofronov G.A. Disadaptive effects in humans after exposure to chemicals containing dioxin // *Organohalogen compounds.* 1994. Vol. 21. P. 379–381.
18. Ecke F., Berglund A.M.M., Rodushkin I., et al. Seasonal shift of diet in bank voles explains trophic fate of anthropogenic osmium? // *Sci Total Environ.* 2018. Vol. 624. P. 1634–1639. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.056
19. Kunisue T., Watanabe M.X., Iwata H., et al. PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in wild terrestrial mammals from Japan: congener specific accumulation and hepatic sequestration // *Environ Pollut.* 2006. Vol. 140, N 3. P. 525–535. doi: 10.1016/j.envpol.2005.07.020
20. Bénéit L., Lallemand J.B., Casella J.F., Philippe H., Heidmann T. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals // *J Virol.* 1999. Vol. 73, N 4. P. 3301–3308. doi: 10.1128/JVI.73.4.3301-3308.1999
21. Zhang W., Zhou S., Gao Y., et al. Alterations in DNA methyltransferases and methyl-CpG binding domain proteins during cleft palate formation as induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice // *Mol Med Rep.* 2018. Vol. 17, N 4. P. 5396–5401. doi: 10.3892/mmr.2018.8521
22. Miousse I.R., Chalbot M.C.G., Lumen A., et al. Response of transposable elements to environmental stressors // *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015. Vol. 765. P. 19–39. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.05.003
23. Ma H.S., Wang E.L., Xu W.F., et al. Overexpression of DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A) is associated with aggressive behavior and hypermethylation of tumor suppressor genes in human pituitary adenomas // *Med Sci Monit.* 2018. Vol. 24. P. 4841–4850. doi: 10.12659/MSM.910608

REFERENCES

1. Rozanov VN, Treger YuA. Assessment of dioxins emission from major sources in the Russian Federation. *Ecology and Industry of Russia.* 2011;2:32–35. (In Russ).
2. Sofronov GA, Bochkov NP, Umnova NV, et al. Ecologo-genetic manifestations of dioxin pathology. *Medical academic journal.* 2006;6(1):163–174. (In Russ).
3. Sycheva LP, Umnova NV, Kovalenko MA, et al. Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of Agent Orange application in Vietnam. *Chemosphere.* 2016;144:1415–1420. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.009
4. Prokopec SD, Houlahan KE, Sun RX, et al. Compendium of TCDD-mediated transcriptomic response datasets in mammalian model systems. *BMC Genomics.* 2017;18(1):78. doi: 10.1186/s12864-016-3446-z
5. Patrizi B, Cumis MS. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):4101. doi: 10.3390/ijms19124101
6. Sofronov GA, Rembovskij VR, Radilov AS, Mogilenkova LA. Modern views on the mechanism of the toxic action of dioxins and their hygienic rationing. *Medical Academic Journal.* 2019;19(1):17–28. (In Russ). doi: 10.17816/MAJ19117-28
7. Agapkina GI, Brodskij ES, Shelepchikov AA, et al. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soils of Moscow-City. *Moscow university soil science bulletin.* 2010;65(3):114–118. doi: 10.3103/s0147687410030038
8. Weber R, Herold C, Hollert H, et al. Reviewing the relevance of dioxin and PCB sources for food from animal origin and the need for their inventory, control and management. *Environ Sci Eur.* 2018;30(1):42. doi: 10.1186/s12302-018-0166-9
9. Goodier JL. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA.* 2016;7:16. doi: 10.1186/s13100-016-0070-z
10. Sookdeo A, Hepp CM, McClure MA, Boissinot S. Revisiting the evolution of mouse LINE-1 in the genomic era. *Mob DNA.* 2013;4(1):3. doi: 10.1186/1759-8753-4-3
11. Veniaminova NA, Vassetzky NS, Kramerov DA. B1 SINEs in different rodent families. *Genomics.* 2007;89(6):678–686. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.02.007
12. Bezel` VS, Muxacheva SV. Trophic levels of small mammals: multi-element composition and toxic load. *Povolzhskiy Journal of Ecology (Saratov).* 2012;1:3–13. (In Russ). doi: 10.1134/s1062359013100014
13. Roumak VS, Umnova NV, Levenkova ES, et al. Dioxins in the environment and the body of animals near landfill: to the methodology of public health risk evaluation. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology).* 2017;24(10):9–15. (In Russ). doi: 10.33396/1728-0869-2017-10-9-15
14. Carnell AN, Goodman JI. The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity. *Toxicol Sci.* 2003;75(2):229–235. doi: 10.1093/toxsci/kfg138
15. OECDilibrary [Internet]. Test No. 489: in vivo mammalian alkaline comet assay, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4, Paris: OECD Publishing, 2016.
16. Gajski G, Žegura B, Ladeira C, et al. The comet assay in animal models: from bugs to whales — (part 2 vertebrates). *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2019;781:130–164. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.04.002
17. Roumak VS, Umnova NV, Poznyakov SP, An NQ, Sofronov GA. Disadaptive effects in humans after exposure to chemicals containing dioxin. *Organohalogen compounds.* 1994;21:379–381.
18. Ecke F, Berglund AMM, Rodushkin I, et al. Seasonal shift of diet in bank voles explains trophic fate of anthropogenic osmium? *Sci Total Environ.* 2018;624:1634–1639. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.056

19. Kunisue T, Watanabe MX, Iwata H, et al. PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in wild terrestrial mammals from Japan: congener specific accumulation and hepatic sequestration. *Environ Pollut*. 2006;140(3):525–535. doi: 10.1016/j.envpol.2005.07.020
20. Bénit L, Lallemand JB, Casella JF, Philippe H, Heidmann T. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J Virol*. 1999;73(4):3301–3308. doi: 10.1128/JVI.73.4.3301-3308.1999
21. Zhang W, Zhou S, Gao Y, et al. Alterations in DNA methyltransferases and methyl-CpG binding domain proteins during cleft palate formation as induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice. *Mol Med Rep*. 2018;17(4):5396–5401. doi: 10.3892/mmr.2018.8521
22. Miousse IR, Chalbot MCG, Lumen A, et al. Response of transposable elements to environmental stressors. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;765:19–39. doi: 10.1016/j.mrrrev.2015.05.003
23. Ma HS, Wang EL, Xu WF, et al. Overexpression of DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA (Cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A) is associated with aggressive behavior and hypermethylation of tumor suppressor genes in human pituitary adenomas. *Med Sci Monit*. 2018;24:4841–4850. doi: 10.12659/MSM.910608

ОБ АВТОРАХ

***Лавренов Антон Русланович**, к.б.н.;
адрес: Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7318-8046>;
elibrary SPIN: 4081-9972;
e-mail: overtaki@mail.ru

Орджоникидзе Кристина Георгиевна,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2955-0631>;
elibrary SPIN: 1658-8379;
e-mail: chiris.ordj@gmail.com

Румак Владимир Степанович, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6645-8677>;
elibrary SPIN: 4477-5112;
e-mail: roumak@mail.ru

Ким Александр Иннокентьевич, д.б.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0398-8694>;
elibrary SPIN: 8606-4506;
e-mail: aikim57@mail.ru

Умнова Наталия Владимировна, д.б.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1615-2194>;
elibrary SPIN: 5586-0738;
e-mail: unv2014@mail.ru

AUTHORS INFO

***Anton R. Lavrenov**, Cand. Sci. (Biol.);
address: 33 Leninsky avenue, 119071, Moscow, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7318-8046>;
elibrary SPIN: 4081-9972;
e-mail: overtaki@mail.ru

Kristina G. Ordzhonikidze,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2955-0631>;
elibrary SPIN: 1658-8379;
e-mail: chiris.ordj@gmail.com

Vladimir S. Roumak, MD, Dr. Sci. (Med.), professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6645-8677>;
elibrary SPIN: 4477-5112;
e-mail: roumak@mail.ru

Alexander I. Kim, Dr. Sci. (Biol.), professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0398-8694>;
elibrary SPIN: 8606-4506;
e-mail: aikim57@mail.ru

Natalia V. Umnova, Dr. Sci. (Med.), professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1615-2194>;
elibrary SPIN: 5586-0738;
e-mail: unv2014@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author