

УДК 576.32:612.42:612.1:504.75.05

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГИОНАЛЬНОЙ ФОНОВОЙ ЧАСТОТЫ СТАБИЛЬНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ У НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ, ПРИЛЕГАЮЩЕЙ К СЕМИПАЛАТИНСКОМУ ИСПЫТАТЕЛЬНОМУ ПОЛИГОНУ

Кенжина Л.Б., Кенесарина А.О., Мамырбаева А.Н.

Филиал «Институт радиационной безопасности и экологии» РГП НЯЦ РК, Курчатов, Казахстан

В работе представлены результаты исследования региональной фоновой частоты стабильных транслокаций методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в разных возрастных группах, которая колеблется в диапазоне от $1,42 \pm 0,3$ до $4,9 \pm 0,5$ на 1000 клеток. Установлено, что частота стабильных хромосомных aberrаций увеличивается с возрастом, и связано это прежде всего с тем, что с возрастом происходит прогрессирующее снижение стабильности хромосомного аппарата, замедление процессов репарации ДНК и регенерации. Влияние вредных привычек, таких как курение, является наиболее исследуемым признаком, оказывающим влияние на уровень транслокаций, поэтому была проведена корреляция между уровнем стабильных хромосомных повреждений и этой вредной привычкой в исследуемых возрастных группах. Расчет фоновой частоты для стабильных хромосомных повреждений произведен при помощи оборудования автоматизированной цитогенетической платформы на базе электронного флуоресцентного микроскопа фирмы Carl Zeiss AxioImager Z2, автоматической системой поиска и анализа метафаз Metafer 4/M Search, ISIS (MetaSystems, Германия) и коммерческих цельнохромосомных ДНК зондов для хромосом 1, 4, 12.

Ключевые слова: флуоресцентная гибридизация *in situ*, стабильные хромосомные aberrации, лимфоциты периферической венозной крови.

ВВЕДЕНИЕ

Активное использование человечеством ионизирующего излучения в различных областях, прежде всего в промышленности и медицине, сопровождается постоянным расширением контингента лиц, контактирующих с ионизирующим излучением. Побочным следствием внедрения этих технологий становится риск потери контроля над источниками радиации и внеплановое облучение людей в условиях радиационных аварий [1, 2]. Учитывая доказанную опасность детерминированных и стохастических эффектов, возникающих в организме человека при воздействии ионизирующих излучений, биодозиметрический контроль при любых масштабах радиационного инцидента стал обязательным элементом противорадиационной защиты и неотъемлемой частью мер по медицинскому обеспечению радиационных инцидентов и аварий в развитых странах мира [3].

Главным принципом цитогенетической оценки повреждающего воздействия мутагенных факторов, в том числе ионизирующей радиации на хромосомный аппарат клеток человека, является количественный учет структурных хромосомных перестроек и изменений плоидности генома путем визуального анализа митотически конденсированных хромосом в цикле метафазы.

Традиционно, дицентрический анализ хромосом продемонстрировал свою надежность и, до сих пор, является лучшим методом для острого сценария облучения [4]. Однако данный метод успешно применим только в ранние сроки после облучения, вследствие постепенной элиминации aberrантных клеток из периферического кровяного русла. Для проведе-

ния ретроспективной оценки поглощенной дозы в условиях давнего облучения (экологического/ профессионального/медицинского) из-за высокой стабильности и накопления с течением времени предпочтительным является индикация хромосомных транслокаций методом флуоресцентной гибридизации *in situ* [5]. Данный метод детекции определяет положение специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах *in situ* при помощи ДНК-зондов, которые гибридизируются (связываются) с комплементарными участками и благодаря тому, что они помечены флуоресцентной меткой, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе хромосом. FISH-метод позволяет четко выявить стабильные хромосомные aberrации в виде транслокаций, представляющих собой обмен участками между исследуемой и другими хромосомами, поскольку ее окрашенный участок в флуоресцентном микроскопе высвечивается на других хромосомах.

Расчет поглощенной дозы трудно поддается количественной оценке, поскольку частота индуцированных событий низкая, а фоновый уровень транслокаций среди неэкспонированных субъектов может проявлять значительную вариабельность. Обширные проведенные работы свидетельствуют, что это может быть обусловлено несколькими факторами, включая возраст, вредные привычки, например, курение сигарет, воздействие химических веществ, наличие клонов аномальных клеток [6] и, возможно, генотипической изменчивостью среди обследуемых.

Изучение характера реализации цитогенетических эффектов в лимфоцитах крови человека в зависимости от качества излучения, дозы и мощности дозы

в условиях экспериментов *in vitro* проводилось в течение трех прошлых десятилетий несколькими ведущими цитогенетическими лабораториями мира или консорциумами исследователей из разных лабораторий [7], однако всесторонний мета-анализ, опубликованный Сигурдсоном и др. в 2008 году, в настоящее время является лучшей международной базой данных с разбивкой по возрасту, полу, расе и привычке к курению. Воздействие табака в основном носит хронический характер, продолжающийся в течение жизни или ее значительной части, синергический эффект которого увеличивается при присоединении других вредных агентов [8]. Частота транслокаций на 1000 клеток в различных возрастных группах по исследованиям ведущих цитогенетических лабораторий мира опубликована в работе С.А. Whitehouse в 2005 году, где она колеблется $0,1 \pm 0,1$ до $17,6 \pm 2,6$ на 1000 клеток. Повышенные фоновые уровни хромосомных аберраций описаны в некоторых местностях Индии (Керала) [9], южных районов Китая [10], северных районах Ирана [11]. В исследованиях, в которых изучался эффект пола, не найдено доказательств каких-либо различий [12] даже в возрастных группах. Значения фоновых частот транслокаций для различных видов ионизирующего излучения, полученные разными исследователями и ведущими биодозиметрическими лабораториями мира варьируют в диапазоне от 0,0001 до $0,072 \pm 0,0021$ на 1000 клеток [13].

Таким образом, данная работа направлена на определение стандартной фоновой частоты стабильных транслокаций, которая важна для построения собственной калибровочной кривой «доза-эффект».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика группы исследования. Для исследований сформирована группа из 37 добровольцев, проживающих в г. Курчатов. Это условно здоровые люди, никогда ранее не подвергавшиеся воздействию ионизирующего излучения, за исключением медицинских рентген диагностирующих процедур. Для определения влияния пола на спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови вся выборка была разделена на две группы –

мужчины (48,6 %) и женщины (51,4 %). При определении зависимости уровня цитогенетических повреждений от возраста доноров группа ранжирована по возрастным категориям 20–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69 лет и по признаку курения (таблица 1).

После получения информированного согласия проведено анкетирование, на основании чего не было отмечено повышенного или хронического воздействия факторов, которые могут повлиять на частоту хромосомных аберраций, таких, как химиотерапия, отравления химическими веществами и острое облучение в анамнезе. В ходе анкетированного опроса выяснены паспортные данные, условия и сроки проживания, характер питания, источники воды, используемые для питья и хозяйственных нужд, наличие хронической патологии.

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов. Материалом исследования послужила периферическая венозная кровь в количестве 6 мл, взятая из локтевой вены в стерильные пробирки с литий гепарином из расчета 50МЕ на 1 мл цельной крови, с соблюдением асептических условий на базе процедурного кабинета для цитогенетического анализа. Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление хромосомных препаратов проводили, используя стандартный протокол [3].

Окрашивание. Окраска препаратов проводилась после 24-х часового хранения препаратов в термостате при $t = 37^\circ\text{C}$. Для окрашивания методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [3] использовался коммерческий набор фирмы *Meta Systems GmbH*, включающий коктейль цельнохромосомных молекулярных ДНК-зондов, меченных флюорохромами для хромосом 1, 4, 12, представляющих у мужчин 19,17 % генома, у женщин 18,87 % [60].

Денатурация и Гибридизация. Процедура проводилась согласно протоколу методики в течении 90 часов и при $t = 37^\circ\text{C}$. Контрокрашивание препаратов детергентом DAPI/Antifade производилось в темном помещении нанесением 50 мкл смеси на стекло. Хранение FISH-препаратов производилось в герметичных светонепроницаемых контейнерах при температуре -20°C .

Таблица 1. Общая характеристика обследованной группы

Пол	Всего чел.	Признак	Возрастные группы, лет					Кол-во человек
			20–29	30–39	40–49	50–59	60–69	
муж	18	курящие	—	3	3	2	3	11
		не курящие	2	3	1	1	—	7
жен	19	курящие	1	1	2	—	1	5
		не курящие	4	2	4	2	2	14
ВСЕГО			7	9	10	5	6	37

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГИОНАЛЬНОЙ ФОНОВОЙ ЧАСТОТЫ СТАБИЛЬНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ У НАСЕЛЕНИЯ,
ПРОЖИВАЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ, ПРИЛЕГАЮЩЕЙ К СЕМИПАЛАТИНСКОМУ ИСПЫТАТЕЛЬНОМУ ПОЛИГОНУ**

Таблица 2. Возрастная динамика распределения стабильных аберраций

ИРБЭ (Казахстан)					NRPB (Украина)	BFS (Германия)	IRSN (Франция)
Возр-ая группа	Кол-во человек	Кол-во проанализ. клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток
20–29	7	12711	22	1,73±0,4	—	4,1±1,1	2,0±0,8
30–39	9	12635	18	1,42±0,3	2,8±0,6	3,7±0,7	3,7±2,2
40–49	10	8599	27	3,14±0,6	3,4±0,6	8,2±1,5	4,6±2,3
50–59	5	5535	27	4,9±0,9	5,0±0,6	8,1±1,3	3,2±1,4
60–69	6	7781	33	4,2±0,7	6,5±0,7	10,5±2,1	3,8±3,0
ВСЕГО	37	47261	127	—	—	—	—

Анализ препаратов. FISH-анализ препаратов лимфоцитов проводили с использованием цитогенетической платформы на базе электронного флуоресцентного микроскопа фирмы *Carl Zeiss AxioImager Z2*, оснащенного световыми фильтрами, специфичными по спектральной пропускной способности DAPI, FITC, Texas Red, Green/Orange, автоматической системой поиска и анализа метафаз *Metafer 4/MSearch (MetaSystems, Германия)*. Непосредственный анализ хромосомных нарушений проводили на изображениях, выводимых на экран монитора при помощи программного обеспечения *ISIS (MetaSystems Software, Германия)*. Хромосома 1 визуализировалась зеленым светом, хромосома 4-красным, хромосома 12-желто-оранжевым, контрокрашенные остальные хромосомы синим цветом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты распределения фоновой частоты транслокаций в различных возрастных стратах представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, частота стабильных хромосомных аберраций, выявляемых FISH-методом, увеличивается с возрастом. Это связано с тем, что с возрастом происходит прогрессирующее снижение стабильности хромосомного аппарата, замедление процессов репарации ДНК и регенерации. Следует отметить, что накопление хромосомных повреждений происходит более активно в возрасте от 40 лет,

скорость этого процесса обусловлена индивидуальной генетической программой (радиочувствительность, радиорезистентность) и совокупностью действующих на организм в течение жизни экзогенных и эндогенных факторов.

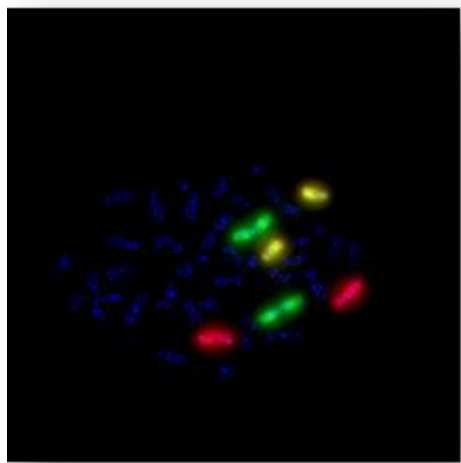
Индикация периферической крови исследуемых стабильных хромосомных аберраций в норме и патологии у исследуемых групп представлена на рисунке 1.

Частота распределения стабильных транслокаций. Влияние вредных привычек, таких как курение, является наиболее исследуемым признаком, оказывающим влияние на уровень транслокаций [14], поэтому была проведена корреляция между уровнем стабильных хромосомных повреждений и этой вредной привычкой в исследуемых возрастных группах, результаты представлены в таблице 3.

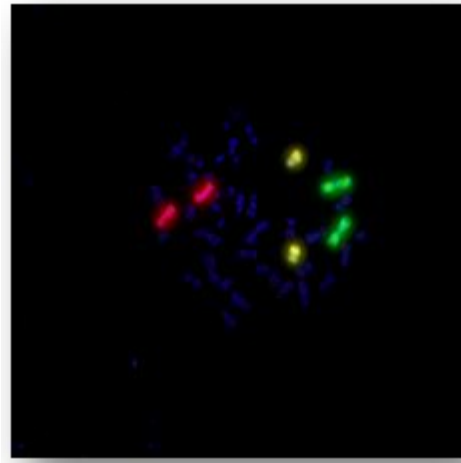
Полученные значения свидетельствуют в целом о превышении частоты транслокаций в группе курящих по сравнению с группой исследуемых, не имеющих этой вредной привычки. Данная тенденция прослеживается не во всех возрастных группах, в первую очередь это связано со статистически малой выборкой людей, малым количеством курящих женщин в молодом возрасте. Обращает на себя внимание тот факт, что в возрастной группе 50–59 лет выявлено наибольшее количество стабильных нарушений хромосомного аппарата, это свидетельствует об очевидном вкладе курения в процесс естественного старения.

Таблица 3. Частота распределения стабильных хромосомных повреждений в возрастных группах по признаку курения

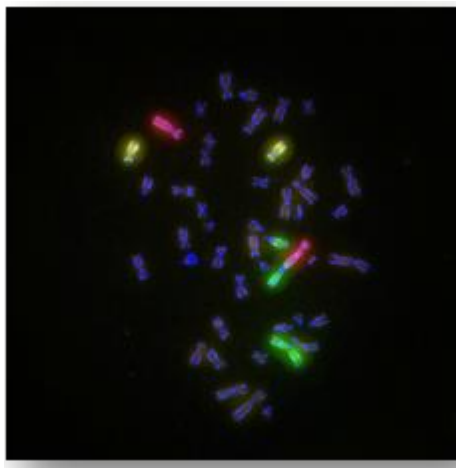
Возр-ая группа	Кол-во человек	Курящие			Кол-во человек	Не курящие		
		Кол-во проанализ. клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000 клеток		Кол-во проанализ. клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000 кл
20–29	1	430	—	—	6	12281	22	1,79±0,3
30–39	4	4408	9	2,04±0,6	5	8227	9	1,09±0,3
40–49	5	5530	24	4,34±0,8	5	3069	3	0,97±0,3
50–59	2	3137	20	6,37±1,4	3	2398	7	2,92±1,1
60–69	4	5043	26	5,15±1,0	2	2738	7	2,55±0,9
ВСЕГО	16	18548	79		21	28713	48	



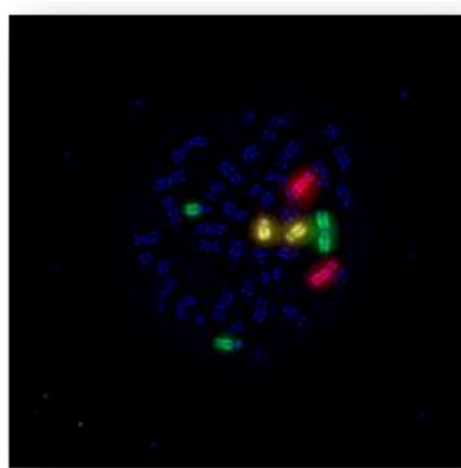
а)



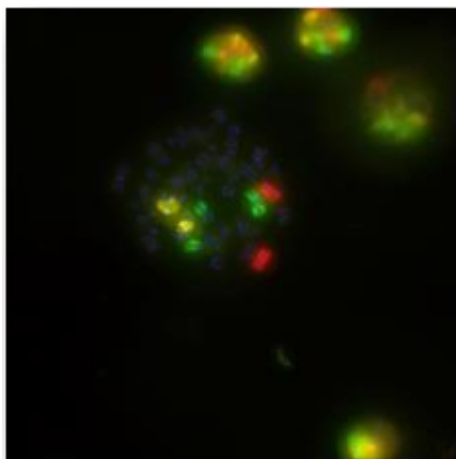
б)



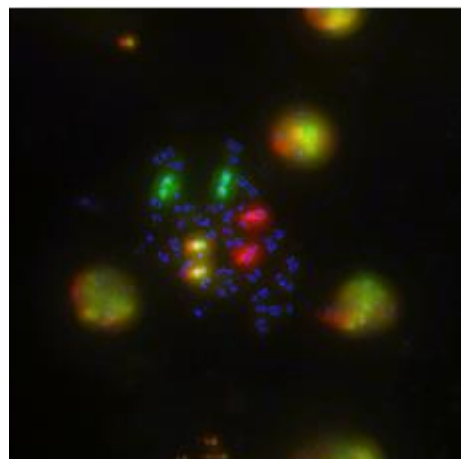
в)



г)



д)



е)

Рисунок 1. Стабильные хромосомные aberrации методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в норме (а, б), в патологии у исследуемых групп (в, г), в группе курящих (д, е)

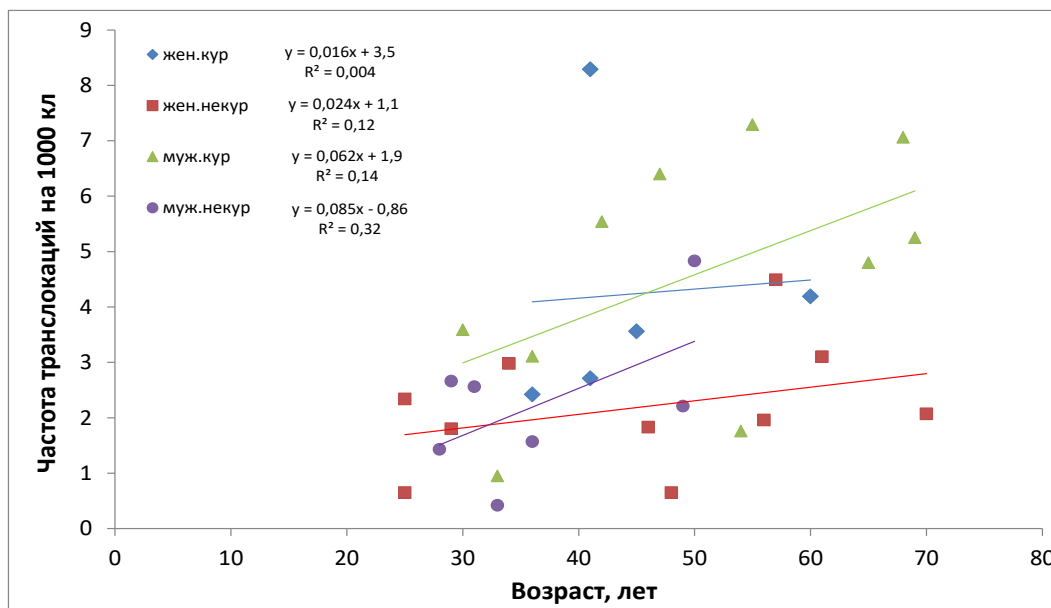


Рисунок 2. Графическое представление распределения фоновой частоты стабильных транслокаций по полу, возрасту и признаку курения

Классическая интерпретация образования обменных aberrаций (дицентриков, транслокаций) предполагает линейно-квадратичную зависимость «доза-эффект», которая описывается следующим уравнением:

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2,$$

где Y – частота хромосомных aberrаций, D – доза ионизирующего облучения, коэффициент C – спонтанный, фоновый уровень хромосомных aberrаций, α и β – коэффициенты линейно-квадратичной регрессии.

На рисунке 2 представлена аппроксимация фоновой частоты стабильных транслокаций у мужчин и женщин в зависимости от возраста и курения для вычисления индивидуальной ожидаемой величины коэффициента C для уравнения подсчета поглощенной дозы. Данные значения методически правильны для построения в будущем собственной калибровочной кривой «доза-эффект», корректной калькуляции поглощенной дозы человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленная при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) стандартная частота стабильных транслокаций имеет выраженную индивидуальную вариабельность – от $0,97 \pm 0,3$ до $6,37 \pm 1,4$ на 1000 клеток, что соответствует фоновым значениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lloyd D.C. Accidents will happen. // Radiation Protection Dosimetry. – 1999. – Vol. 81, № 2. – P. 83–84.
2. L. Cerezo. Radiation accidents and incidents. What do we know about the medical management of acute radiation syndrome? // Rep Pract Oncol Radiother. – 2011. – № 16 (4). – P. 119–122.
3. Использование цитогенетической дозиметрии для обеспечения готовности и реагирования при радиационных аварийных ситуациях. Международное агентство по атомной энергии. – Вена. – 2014.
4. Romm H, Oestreicher U, Kulka U. Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. // Ann Ist Super Sanita. – 2009. – № 45. – P. 251–259.
5. Cho M.S, Lee J.K, Bae K.S et all. Retrospective biodosimetry using translocation frequency in a stable cell of occupationally exposed to ionizing radiation. // J Radiat Res. – 2015. – № 56 (4). – P. 709–716.

6. James D. Tucker. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry. // Mutation Research. – 2008. – № 659. – P. 211–220.
7. Badr, F.M., Hussain, F.H., Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics// Alcohol. Clin. Exp. Res. – 1982. – № 6. P. 122–129.
8. Thampi M.V., Cheriyan V.D., Kurien C.J. et al. Cytogenetic studies in the high-level natural radiation areas of Kerala. // International Congress Series. – 2002. – Vol. 1225. – P. 207–211.
9. Wang C., Zhang W., Minamihisamatsu M. et al. Chromosome study in high background radiation area in Southern China. // International Congress Series. – 2005. – Vol. 1276. – P. 3–7.
10. M. Ghiassi-Nejad, F. Zakeri, R.Gh. Assaei. Long-term immune and cytogenetic effects of high-level natural radiation on Ramsar inhabitants in Iran. // Journal of Environmental Radioactivity. – 2004. – № 74. – P. 107–116.
11. Kim Y. K., et al. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. // Pharmacogenetics. – 2004. – № 14. – P. 453–463.
12. Lucas J.N., Awa A., Straume T. et al. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. // Int J Radiat Biol. – 1992. – № 62 (1). – P. 53–63.
13. Morton NE. Parameters of the human genome. Proc Natl Acad Sci USA. – 1991 – № 88 (17). – P. 7474–7476.
14. Kulka U., et al. RENEB - Running the European Network of biological dosimetry and physical retrospective dosimetry. // Int J Radiat Biol. – 2017. – 93 (1). – P. 2–14.

СЕМЕЙ СЫНАҚ ПОЛИГОНЫНА ЖАҚЫН АУМАҚТА ӨМІР СҮРІП ЖАТҚАН ТҮРҒЫНДАРДАН ТҰРАҚТЫ ТРАНСЛОКАЦИЯНЫҢ АЙМАҚТАҒЫ АЯЛЫҚ ЖИІЛІГІН АНЫҚТАУ

Л.Б. Кенжина, А.О. Кенесарина, А.Н. Мамырбаева

ҚР ҰҰО РМК «Радиациялық қауіпсіздік және экология институты» филиалы, Курчатов, Қазақстан

Бұл жұмыста, түрлі жастағы топтарда *in situ* флуоресцентті гибридизациялаудың тұрақты транслокация әдісімен 1000 жасушаға $1,42 \pm 0,3$ бастап $4,9 \pm 0,5$ дейінгі диапазонда құбылып отыратын аймақтағы аялық жиіліктің нәтижелері келтірілген. FISH-әдісімен анықталған тұрақты хромосомалық абберация жиілігі жас ұлғайған сайын арта түсетіні және бұл ДНК репарациясы мен регенерация процестерінің баяулауы, хромосомалық аппараттың тұрақтылығының уақыт өткен сайын үдемелі түрде төмендеуіне байланысты болатыны анықталды. Темекі шегу секілді зиянды әдеттер зерттеудегі транслокация деңгейіне әсер етуші нысан болып табылады, сол себепті зерттеуге қатысушы түрлі жас топтарында осы зиянды әдет пен тұрақты хромосомалық зақымданулар деңгейі арасында корреляция жүргізілді. Тұрақты хромосомалық зақымданулар үшін аялық жиілікті есептеу автоматтандырылған цитогенетикалық платформа базасындағы электронды *Carl Zeiss AxioImager Z2* фирмасының флуоресцентті микроскопы, іздестіру автоматты жүйесі мен Metafer 4/M Search, ISIS (*MetaSystems*, Германия) метафазаларды талдамалау, 1, 4, 12 хромосомаларына арналған коммерциялық тұтас хромосомалық ДНК зондылары секілді жабдықтардың көмегімен жүргізілді.

Кілт сөздер: in situ флуоресцентті гибридизациясы, тұрақты хромосомалық абберациялар, перифериялық веналық қан лимфоциттері.

DETERMINING REGIONAL BACKGROUND FREQUENCY OF STABLE TRANSLOCATIONS IN THE POPULATION LIVING IN THE TERRITORY ADJACENT TO THE SEMIPALATINSK TEST SITE

L.B. Kenzhina, A.O. Kenesarina, A.N. Mamyrbayeva

Branch “Institute of Radiation Safety and Ecology” RSE NNC RK, Kurchatov, Kazakhstan

The paper presents results of the regional background frequency of stable translocations using *in situ* fluorescent hybridization in different age groups, which ranges from 1.42 ± 0.3 to 4.9 ± 0.5 per 1000 cells. It found that frequency of stable chromosome aberrations revealed by FISH-technique increases with age. This is due to the fact that with age chromosome stability, DNA reparation and regeneration reduction progressively decelerate. The impact of bad habits such as smoking is the most studied sign affecting the level of translocations; therefore, correlation was made between the level of stable chromosome damage and this bad habit in age groups of interest. Background frequency of stable chromosome damage was calculated by means of equipment of automated cytogenetic platform based on the electronic *Carl Zeiss AxioImager Z2* fluorescent microscope, automatic Metafer 4/M Search, ISIS (*MetaSystems*, Germany) metaphase search and analysis system and using commercial whole chromosome DNA probes for chromosomes 1, 4, 12.

Key words: in situ fluorescent hybridization, stable chromosome aberrations, lymphocytes of peripheral black blood.