

УДК 576.32:612.42:612.1:504.75.05

ОСВОЕНИЕ МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ ЛИМФОЦИТОВ С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (СВМН)

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

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

В статье представлено освоение метода цитогенетической биологической дозиметрии – микроядерного теста с блокированием цитокинеза в лимфоцитах периферической крови человека на базе Института радиационной безопасности и экологии НЯЦ РК. Апробация микроядерного теста с блокированием цитокинеза проведена с использованием автоматизированной цитогенетической платформы на базе электронного флуоресцентного микроскопа фирмы Carl Zeiss AxioImager Z2, автоматической системы поиска и анализа метафаз Metafer 4/MSearch (MetaSystems, Германия). Установлено, что базовая частота микроядер у исследуемых групп варьирует от 2,12 до 18,1 на 1000 двухъядерных клеток, что соответствует стандартным фоновым значениям в мире (по литературным данным).

Ключевые слова: микроядерный тест с блокированием цитокинеза, микроядро, хромосомные aberrации, лимфоциты периферической венозной крови, биологическая дозиметрия.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях возрастающей техногенной активности и технологического прогресса, человечество попадает под действие постоянно усиливающегося негативного влияния радиации, мутагенов химической и биологической природы. Повышенный радиационный фон, профессиональное облучение работников атомной промышленности при контакте в производственных условиях с радиационным воздействием, возрастающее использование радиации в медицине и другие факторы отягощают наследственность человека и провоцируют возрастание частоты генетических и онкологических заболеваний [1]. Международное агентство по атомной энергии официально сообщило о 400 эпизодах чрезмерного облучения с применением высоких доз облучения.

Наряду с внедрением биофизических методов биодозиметрии важное значение имеет определение индивидуальной поглощенной дозы облучения, методами цитогенетической биологической дозиметрии используя лимфоциты периферической крови, преимуществом которых является учет индивидуальной радиорезистентности и радиочувствительности человека. Метод микроядерного тестирования с блокированием цитокинеза рекомендован Международным агентством по атомной энергии как эффективный индикатор радиационно-индуцированных биомаркеров, наряду с дицентрическим методом и методом флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Микроядерный тест (МТ) лимфоцитов периферической крови, основанный на экспрессии микроядер при кратковременном культивировании лейкоцитов используется для скрининга генотоксических соединений *in vitro* и *in vivo*. Микроядра – это небольшие ДНК-содержащие фрагменты хромосом, которые, как правило, связаны с такими повреждениями генома, как ацентрические фрагменты или целые хромо-

сомы, отставшие в ана-телофазе митоза от веретена деления и не вошедшие в главные дочерние ядра. Впервые данный механизм экспрессии микроядер был описан в 1976 г. для проэритробластов *in vivo* и *in vitro* с использованием ингибитора цитокинеза Цитохалазина В в 1985 г. [2]. С тех пор. в исследованиях доказана связь спонтанного уровня микроядер с полом и возрастом доноров [3], наличием опухолей [4], а также с экспозицией генотоксическими факторами окружающей среды [5] и производства [6]. Не менее важным следует считать феномен формирования микроядер при малигнизации клеток, вызванный повреждением хромосом [7].

Актуальность и востребованность данной методики продемонстрировали межлабораторные сравнения Европейской биодозиметрической сети в 2016 г. в рамках 7 Рамочной программы и MultiBioDose [8], по результатам данных 16 лабораторий из 16 стран показатели стандартной фоновой частоты микроядер блокированных цитокинезом в Европейских странах находятся в пределах от 2 до 39 на 1000 бинуклеарных клеток. Выводы данного проекта свидетельствуют о том, что анализ СВМН - полезный инструмент сортировки для крупномасштабных радиационных чрезвычайных ситуациях, связанных с радиационным воздействием.

В таблице 1 приведены данные о стандартной базовой частоте микроядер в лабораториях разных стран, имеющие данные по фоновой стандартной частоте микроядер, блокированных цитокинезом.

Как видно из вышеизложенного, фоновые частоты микроядер на 1000 бинуклеарных клеток имеют значительный разброс в диапазоне от 0 до 39, таким образом, демонстрируя мультипараметрическую этиологию, связанную с эндо и экзогенными факторами, влияющими на физиологическое состояние генома.

**ОСВОЕНИЕ МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ ЛИМФОЦИТОВ
С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (СВМН)**

*Таблица 1. Стандартная фоновая частота микроядер, блокированных цитокинезом в мире
(литературные данные)*

Лаборатория, страна	Научное учреждение, организация	Частота микроядер на 1000 бинуклеарных клеток
Tehran, Iran	Nuclear Science and Technology Research Institute	6-21/1000 BN
Jakarta - Indonesia	Nuclear Medicine Technique and Radiation Biology, Center for Technology of Radiation Safety and Metrology (PTKMR), National Nuclear Energy Agency of Indonesia (BATAN)	2,5-19/1000 BN
Seoul - Korea	Korea Institute of Radiological & Medical Sciences	1-13,5 /1000BN
Edirne -Turkey	Trakya University, Medical Faculty, Medical Biology	5-25 /1000BN
Belgrade - Serbia	Serbian Institute of Occupational Health "Dr Dragomir Karajovic"	1-10,4/1000BN
India	Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences	5-20,8/1000 BN
India	Bhanha Atomic Research Centre	3-36/1000 BN
China	Shanghai Second Medical University	0-7/1000 BN
Kurchatov - Kazakhstan	Institute of Radiation Safety and Ecology	2,06 -18,1/1000 BN
Vienna - Austria	IAEA	0-40/1000 BN

Большое внимание к МТ с блокированием цитокинеза определяет исключительно высокий уровень стандартизации и гармонизации данной методики для достижения надежных и сопоставимых оценок поглощенной дозы человека, учитывая индивидуальную радиочувствительность и радиорезистентность. На его базе разработан Межгосударственный стандарт ISO 17099:2014(EN) «Радиологическая защита. Критерии эффективности для лабораторий, использующих анализ микроядерного теста с блокированием цитокинеза (СВМН) в лимфоцитах периферической крови для биологической дозиметрии» который свидетельствует о международном признании данного метода как индикатора радиационного и мутагенного воздействия на живые организмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованной группы

Для освоения данной методики была сформирована группа из 12 добровольцев-мужчин, которые по роду своей профессиональной деятельности имели генотоксические факторы, связанные с полевыми работами на территориях Семипалатинского испытательного полигона. Это условно здоровые люди, с одинаковым режимом дня, никогда ранее не подвергавшиеся воздействию ионизирующего излучения, за исключением медицинских рентгенологических процедур. Для определения спонтанного уровня микроядер в лимфоцитах крови группа ранжирована по возрастным категориям, так как частота микроядер с возрастом увеличивается.

Таблица 2. Общая характеристика обследованной группы

Пол	Всего, чел.	Признак	Возрастные группы				
			20-29	30-39	40-49	50-59	60-69
Муж	6	курящие	1	1	2	1	1
	6	некурящие	1	2	1	1	1
	12		2	3	3	2	2

Поскольку в литературных данных наиболее описываемым признаком, влияющим, на частоту микроядер, описан признак курения [8, 9], мы так же использовали ранжирование группы по этому признаку (таблица 2).

После получения информационного согласия проведено анкетирование, на основании чего были выяснены следующие данные: анамнез жизни, вредные привычки, радиационный маршрут проживания, особенности питания и другие факторы, которые могут повлиять на частоту микроядер, такие, как химиотерапия, отравления химическими веществами, хроническая соматическая патология и острое облучение в анамнезе.

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. Для блокирования цитокинеза на стадии метафазы после 24 часов культивирования, во флаконы с культурой клеток добавляли раствор Цитохалазина В.

Фиксация и подготовка препаратов

Стандартные процедуры гипотонизации (0,14М KCl), двукратной фиксации клеток проводили с помощью свежеприготовленный фиксатора (смесь метилового спирта с ледяной уксусной кислотой) в количестве 5-7 мл. Последнюю процедуру повторяли 3 раза, до полной прозрачности супернатанта. Для получения препаратов метафазных хромосом с помощью пастеровской пипетки, наносили 50 мкл клеточной суспензии на охлажденное влажное предметное стекло и высушивали.



Рисунок 1. Этап автоматической визуализации и фотографирования бинуклеарных клеток при помощи классификатора Micronuclei (Metafer 4/MSearch, MetaSystems, Германия)

Окрашивание

Окрашивание рутинным методом проводилась 2 % раствором Гимза на фосфатном буфере с pH 6.8 в течение 6–10 минут.

Анализ препаратов

Для микроядерного анализа препаратов лимфоцитов использовали цитогенетическую платформу 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 микроядер в классификаторе Micronuclei и автоматического подсчета микроядер Metafer 4/MSearch (MetaSystems, Германия) [10].

Непосредственный подсчет микроядер в бинуклеарных лимфоцитах проводили на изображениях, выводимых на экран монитора при помощи программного обеспечения MetaSystemsSoftware (Германия) (рисунок 1). Подсчет микроядер проводили по критериям МАГАТЭ, учитывая следующие характеристики:

- 1) Клетки должны быть двухъядерными.
- 2) Два ядра в двухъядерной клетке должны иметь неповрежденные ядерные оболочки и должны находиться в одной и той же цитоплазме.
- 3) Два ядра в двухъядерной клетке должны быть приблизительно равными по размеру, рисунку окрашивания и интенсивности окрашивания.
- 4) Два ядра внутри двухъядерной клетки могут быть не связаны или могут быть прикреплены одним или несколькими тонкими нуклеоплазматическими мостами, ширина которых составляет не больше 1/4 диаметра ядра.

5) Два основных ядра в двухъядерной клетке могут прикасаться друг к другу, но идеально не должны накладываться друг на друга. Клетка с двумя накладывающимися ядрами может быть подсчитана лишь в том случае, если границы любого из ядер различимы.

6) Граница цитоплазмы или оболочка двухъядерной клетки должны быть не повреждены и четко отличимы от границ цитоплазмы смежных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты распределения микроядер у исследуемых доноров представлены в таблице 3.

Таблица 3. Количественные характеристики результатов микроядерного теста с блокированием цитокинеза

Исследуемые доноры	Распределение микроядер в двухъядерных клетках				Всего ВН клеток	Всего МЯ	Частота МЯ на 1000ВН
	0МЯ	1МЯ	2МЯ	3МЯ			
Донор 1	2076	8	–	–	2084	8	3,84
Донор 2	3754	13	2	–	3769	15	3,98
Донор 3	3810	16	2	–	3828	18	4,70
Донор 4	2248	14	–	–	2262	14	6,19
Донор 5	3321	10	–	–	3331	10	3,01
Донор 6	1715	14	3	–	1732	17	9,81
Донор 7	3394	7	–	–	3401	7	2,06
Донор 8	4238	10	2	–	4250	12	2,82
Донор 9	2622	7	–	–	2629	7	2,66
Донор 10	3087	14	2	–	3103	16	5,15
Донор 11	1837	9	1	–	1846	10	5,41
Донор 12	1302	21	3	–	1326	24	18,1
ВСЕГО:	33404	143	15	–	33562	158	

Как видно из таблицы, частота микроядер у исследуемых варьирует в диапазоне от 2,12 до 18,09 на 1000 бинуклеарных клеток, что соответствует литературным данным по спонтанной фоновой частоте и отражают физиологическое состояние организма, связанное с концентрацией ферментов антиоксидантной защиты и иммунным статусом организма, которые играют немаловажную роль в адаптивном ответе на генотоксиканты внешней среды.

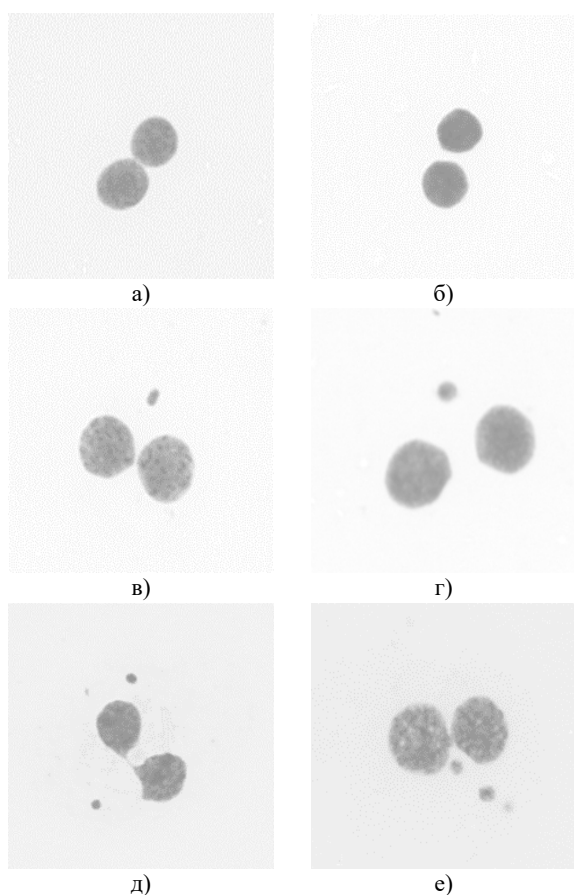


Рисунок 2. Анализ микроядер в двуядерных клетках в норме (а, б) и в патологии у исследуемых групп с одним (в, г) и двумя микроядрами (д, е)

Индикация микроядер в двухъядерных лимфоцитах периферической крови исследуемых в норме и патологии представлены на рисунке 2. Распределение средней частоты микроядер в возрастных группах по возрасту и признаку курения представлено в таблице 4.

Таблица 4. Распределение средней частоты микроядер в возрастных группах и по признаку курения

Признак	Возрастные группы				
	20–29	30–39	40–49	50–59	60–69
курение	3,84	3,98	4,92	6,19	18,1
возраст	2,06	2,74	3,01	5,41	9,81

Наиболее высокие цифры наблюдаются у обследуемых старше 60 лет, причем максимальные значения у донора, имевшем в анамнезе стаж курильщика более 30 лет, таким образом, демонстрируя установленные закономерности, связанные с возрастом и вредными привычками, такими как курение.

Из данной таблицы видно, что возраст и пол – наиболее важные демографические переменные, влияющие на индекс МЯ. Доноры, которые имеют вредную привычку курения, показали увеличенные частоты МЯ по сравнению с некурящими.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые в Казахстане, на базе Института радиационной безопасности и экологии освоено метод микроядерного теста лимфоцитов с блокированием цитокинеза. Обнаруженные значения частоты микроядер варьируют от 2 до 18 на 1000 двухъядерных клеток, что соответствует стандартным фоновым значениям в мире (по литературным данным).

Микроядерный тест лимфоцитов с блокированием цитокинеза является чувствительным и быстрым инструментом в биологической дозиметрии. Он обладает большим потенциалом как надежный метод сортировки и оценки поглощенной дозы облучения в чрезвычайных радиационных ситуациях с большим количеством людей и как следствие обеспечит эффективное принятие решений для их будущего здоровья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Разработка и внедрение методов контроля доз персонала предприятий ядерно-топливного цикла и населения: отчет О НИР (промежуточ.) / Институт радиационной безопасности и экологии НЯЦ РК (ИРБЭ НЯЦ РК); рук. С. Н. Лукашенко; исполн.: А. Н. Шатров, Ж. А. Байгазинов. – Курчатов: ИРБЭ НЯЦ РК, 2015. – 74с. – № ГР 0115РК02082. – Инв. № 0215РК03396.
2. Beinke C., Port M., Riecke A. et al Adaption of the Cytokinesis-block micronucleus cytome assay for improved triage biodosimetry // Radiation Research. – 2016. – № 185. – P. 461–472.
3. Bhatia A., Kumar Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications // APMIS. – 2013. – № 121 (7). – P. 569–581.
4. Occupational exposure to pesticides in tobacco fields: the integrated evaluation of nutritional intake and susceptibility on genomic and epigenetic instability // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2018. – ISBN № 7017423.
5. Jovicic D., Pajic J., Radivojevic L. et al. Micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in a Serbian human population exposed to pesticides // Pestic. Phytomed. – 2015. – № 30 (1). – P. 51–60.
6. Theodore P. Rasmussen. Stem Cells in Birth Defects Research and Developmental Toxicology // John Wiley & Sons. – 2018. – ISBN № 1119283221.

7. Bonassi S., Fenech M., Lando C. et al. Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2001. – № 45. – P. 31–45.
8. Depuydt J., Baeyens A., Barnard S. Renb intercomparison exercises analyzing micronuclei (Cytokinesis-block Micronucleus Assay) / J. Depuydt, A. Baeyens, S. Barnard [et al] // Int. Journal of radiation biology. – 2016. – № 93. – P. 36-47.
9. H. Thierens., A. Vral., M. Barbe., B. Aousalah., L. De Ridder. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay// Mutation Research. – 1999. – № 445. – P. 105–111.
10. Stefano Bonassi., Monica Neri., Cecilia Lando., Marcello Ceppi. et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project // Mutation Research. – 2003. – № 543. – P. 155–166.

БИОЛОГИЯЛЫҚ ДОЗИМЕТРИЯ ӘДІСІН МЕНГЕРУ ЦИТОКИНЕЗДІ БҰҒАТТАУ АРҚЫЛЫ ЛИМФОЦИТТЕРДІ МИКРОЯДРОЛЫҚ ТЕСТІЛЕУ (СВМН)

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

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

Мақалада ҚР ҰЯО Радиациялық қауіпсіздік және экология институтының базасында цитогенетикалық биологиялық дозиметрия әдісін - адамның перифериялық қанының лимфоциттарында цитокinezді бұғаттау арқылы микроядролық тестілеуді менгеру ұсынылған. Цитокinezді бұғаттау арқылы микроядролық тестілеуді сынау Carl Zeiss AxioImager Z2 фирмасының электрондық флуоресценттік микроскоп базасында автоматтандырылған цитогенетикалық платформаны және Metafer 4/MSearch (MetaSystems, Германия) метафазаларды автоматты іздеу және талдау жүйесін пайдалана отырып жүргізілген. Анықталғандай, зерттеліп жақтан топтарда 1000 екі ядролы клеткаларға келетін микроядролардың базалық жиілігі 2,12-ден 18,1 дейін құбылады, бұл элементтегі стандартты аялық мәндерге сәйкес келеді (әдеби деректер бойынша).

Кілт сөздер: цитокinezді бұғаттау арқылы микроядролық тестілеу, микроядро, хромосомалық аберрациялар, перифериялық веналық қанның лимфоциттері, биологиялық дозиметрия.

ADOPTION OF THE « CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS TEST OF LIMPHOCITES » (СВМН) BIOLOGICAL DOSIMETRY METHOD

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

Branch «Institute of Radiation Safety and Ecology» of the RSE NNC RK, Kurchatov, Kazakhstan

The paper provides procedure of «Micronuclear Test with Cytogenesis-Block in Lymphocytes of Peripheral Blood of Humans» cytokinesis-block micronucleus test method adoption in the Institute of Radiation Safety and Ecology of the NNC RK. Micronuclear test with blockage of cytogenesis was tested using automated cytogenetic platform based on digital fluorescent microscope Carl Zeiss AxioImager Z2, Metafer 4/MSearch, automated system for search and analysis of metaphases (MetaSystems, Germany). It was found, that base micronuclei frequency of the researched groups ranges between 2.12 and 18.1 per 1000 of binuclear cells, that corresponds to standard background values in the world (according to the bookish data).

Keywords: cytogenesis blockage micronuclear test, micronuclei, chromosome aberrations, lymphocytes of peripheral vein blood, biological dosimetry.