

М.А. ПІЛІНСЬКА, С.С. ДИБСЬКИЙ

Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ

СПОНТАННИЙ РІВЕНЬ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ, ВСТАНОВЛЕНИЙ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ОСІБ РІЗНОГО ВІКУ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ FISH



Для встановлення спонтанної частоти стабільних хромосомних аберацій у мешканців України проведено цитогенетичне обстеження двох неекспонованих груп чоловіків (середній вік 23 та 53,5 років відповідно) з використанням методу FISH-WCP. Виявлено значні міжіндивідуальні коливання спонтанної частоти стабільних аберацій у осіб одного віку, тенденцію до перевищення вікової норми для середньогрупових цитогенетичних показників, тренд до зростання середньої сумарної частоти транслокацій з віком (0,009 та 0,013 на клітину на геном відповідно).

© М.А. ПІЛІНСЬКА, С.С. ДИБСЬКИЙ, 2004

Вступ. Однією з перспективних новітніх технологій сучасної цитогенетики вважається метод флуоресцентної *in situ* гібридизації метафазних хромосом людини з ДНК-зондами (FISH), використання якого в різних галузях медичної генетики відкрило нові можливості як для діагностики спадкової патології (ДНК-зонди до певних хромосомних локусів), так і для оцінки інтенсивності соматичного хромосомного мутагенеза в різні строки після дії іонізуючого випромінювання (ДНК-зонди до цілих окремих хромосом — FISH-WCP) [1]. За допомогою останнього виявляються стабільні аберації хромосомного типу (транслокації, інсерції), частота яких залежить від дози опромінення і майже не змінюється з часом, що дозволило застосувати метод FISH-WCP для індикації дії іонізуючої радіації на людину та біологічної дозиметрії в діапазоні доз ~ 20–200 сГр [2–22].

Як відомо, важливою кількісною характеристикою мутагенеза є спонтанний рівень хромосомних аберацій [23–25]. Тому для оцінки радіоіндукованого цитогенетичного ефекту потрібні вихідні дані щодо спонтанного рівня типів хромосомних аберацій, що вивчались, в неекспонованих групах людей. В цьому напрямку в провідних цитогенетичних лабораторіях світу виконано чимало досліджень (спеціальних та при обстеженні контрольних груп), в результаті яких одержано такі дані і встановлено ряд певних закономірностей — більш високий (в 2–10 разів) рівень спонтанної частоти стабільних аберацій (транслокацій) у порівнянні з нестабільними (дицентриками); достовірне зростання спонтанного рівня транслокацій з віком (особливо після 40–50 років); значна міжіндивідуальна варіабельність спонтанної частоти стабільних аберацій в окремих вікових групах; встановлене тільки в деяких дослідженнях незначне превалювання повних (two-way) транслокацій над неповними (one-way); низький спонтанний рівень клонів аномальних клітин; незалежність спонтанного рівня стабільних аберацій від статі; слабкий вплив куріння тютюну (особливо у швидких NAT 2 ацетиляторів) на спонтанну частоту транслокацій [2–13, 21]. Ряд питань, як то вплив генотипу, стилю життя (life-style) і особливо місця проживання людини на спонтанний рівень транслокацій в різних вікових групах, залишається невирішеним. За думкою Dag-

roudi [4], Lukas [8] та Tucker [12], для одержання інтегральних даних щодо спонтанного рівня стабільних хромосомних аберацій в соматичних клітинах людини доцільно накопичувати результати FISH-WCP аналізу неекспонованих груп людей в різних країнах світу, тобто створювати так званий банк локальних контролів. Нині нам невідомі спеціальні роботи, присвячені визначенню спонтанної частоти транслокацій у мешканців України. Тільки в одній роботі наведено дані щодо рівня аберацій хромосом в контрольній групі з м. Харкова (12 осіб, середній вік 39 ± 4 роки), встановлений з використанням методу FISH-WCP [21].

За допомогою методу FISH-WCP нами оцінено цитогенетичний статус у 20 неекспонованих чоловіків, що живуть у м. Києві, двох вікових категорій. Дослідження виконані в рамках Українсько-Американського проекту «Лейкемія», де обидві групи були використані як контрольні при верифікації офіційних доз опромінення у ліквідаторів наслідків Чорнобильської аварії.

Матеріал та методика. Групу I склали 10 практично здорових осіб (усі чоловіки у віці 23 років на момент обстеження, курсанти Військової медичної академії України), які заперечували свідомий контакт з мутагенними факторами, включаючи іонізуюче опромінення. В групу II включили 10 військовослужбовців з хронічними захворюваннями серцево-судинної системи, які не мали професійного контакту з іонізуючою радіацією чи с іншими генотоксичними агентами (всі чоловіки у віці 42–64 роки на момент обстеження, середній вік — 53,5 років).

Для одержання препаратів метафазних хромосом цільну венозну гепаринізовану кров (2 мл) культивували за полумікрометодом (0,5 мл крові для однієї культури) без контролю клітинного циклу згідно із стандартним протоколом лабораторії цитогенетики НЦРМ [15]. Культуру лімфоцитів інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном («Sigma», США) без ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, з фітогемаглютиніном (PHA, Difco-P, США) протягом 48–50 год (останні 3 год — з колцемідом, Colcemid, «Sigma», США) при температурі $37,5^\circ\text{C}$, що дозволяло аналізувати клітини переважно першого

мітозу. Після гіпотонічної обробки (0,075 М розчином KCl) та фіксації (абсолютним етанолом та льодяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3 : 1) одержували фіксовані клітинні осадки, які зберігали у морозильній камері при температурі -20°C до моменту приготування препаратів метафазних хромосом.

Препарати для FISH-аналізу готували за 15 діб до проведення флуоресцентної *in situ* гібридизації. Для гібридизації використовували набір безпосередньо мічених флуорохромом «Spectrum orange» ДНК-зондів до цілих хромосом № 1, 2 і 4 («Vysis», США), які становлять ~22 % диплоїдного геному та дозволяють виявляти ~35 % всіх транслокацій. Обробку препаратів проводили згідно з протоколом фірми «Vysis» (США), успішно адаптованим для роботи в умовах України, який включає такі стадії: специфічну попередню обробку препаратів, гібридизацію (24 год при температурі 37°C), промивку, контрфарбування хромосом флуоресцентним барвником DAPI-1 (4,6-діамідіно-2-феніліндолил) в спеціальному «antifade» розчині, який запобігає швидкому вицвітання препарату при мікроскопуванні в УФ-світлі. Препарати аналізували під люмінесцентним мікроскопом «Axioscope» (Німеччина), який мав люмінесцентну 100-ваттну лампу («USHIO», Японія) та набір спеціальних фільтрів (DAPI/ORANGE dual pass filter set, «Zeiss», Німеччина), що дають змогу окремо та одночасно візуалізувати обидва флуорохроми, завдяки чому хромосоми-мішені, фарбовані Spectrum Orange (painted), та контрфарбовані DAPI-хромосоми (unpainted) мають різний колір (рожево-оранжевий та голубий відповідно), який залежить від використаного фільтра. Панцентромірні зонди не вживали, оскільки при використанні флуорохрому DAPI структура хромосом та положення центроміри виявляються досить чітко. Обміни частинами між «painted» та «unpainted» хромосомами приводили до виникнення двокольорових структур, які містили одну або декілька центромір — повних (реципрокних, збалансованих, two-way) та неповних (one-way) транслокацій, інсерцій, поліцентриків. Однокольорові «painted» безцентромірні структури приймали за ацентрики.

Ідентифікацію та облік хромосомних аберацій проводили згідно з PAINT номенклатурою

[26]. Реципрокні та нереципрокні транслокації вважали за одну подію.

Від кожного обстеженого аналізували по 1000 метафаз (по 500 метафаз кожним з двох цитогенетиків, з перехресним контролем). Всього проаналізували 20 000 метафаз.

Частоту реально виявлених транслокацій перераховували на геном-еквівалент за формулою Lucas [27]:

$$Fg = Fp/2,05fp (1-fp),$$

(де Fg — частота транслокацій на геном; Fp — виявлена частота транслокацій з участю «painted» хромосом; fp — доля генома, яку складають хромосоми-мішені (для використаного нами хромосомного коктейля — 22 %).

Результати досліджень та їх обговорення. Результати флуоресцентного цитогенетичного аналізу наведені в табл. 1 і 2, де представлені дані щодо частоти різного типу хромосомних аберацій, перерахованої на клітину на геном-еквівалент. Інсерції, які зустрічались дуже обмежено, включено до категорії повних транслокацій. Інші аберації були представлені тільки поодинокими парними ацентричними фрагментами.

Як видно з даних, наведених в табл. 1, при FISH-аналізі практично в усіх обстежених осіб молодшого віку реєстрували повні та/чи неповні хромосомні транслокації, індивідуальні рівні яких коливались від 0,003 до 0,008 на клітину на геном та від 0,002 до 0,008 на клітину на геном відповідно. В 4 випадках домінували повні транслокації, в 4 — неповні, в 2 — повні та неповні транслокації зустрічались з однаковою частотою, завдяки чому середньогрупові рівні кожного з цих типів аберацій практично не відрізнялися і складали $0,005 \pm 0,001$ та $0,004 \pm 0,001$ на клітину на геном відповідно. Сумарна частота стабільних аберацій хромосом коливалась від 0,006 до 0,014 на клітину на геном і становила в середньому $0,009 \pm 0,001$.

Нестабільні хромосомні аберації (парні ацентричні фрагменти) були виявлені у 6 обстежених з частотою 0,003 на клітину на геном; їхній середньогруповий рівень складав 0,002 на клітину на геном, а сумарний внесок в загальну частоту аберацій становив лише 18 %, що істотно відрізняється від результатів традиційного цитогенетичного аналізу неекспонованих популяцій, де

Таблиця 1
Результати, отримані при цитогенетичному обстеженні методом FISH осіб з групи I

№	Транслокацій на клітину на геном			Інших аберацій на клітину на геном	Всього аберацій на клітину на геном
	Повні	Неповні	Всього		
1	0,011	0,000	0,011	0,003	0,014
2	0,003	0,003	0,006	0,003	0,009
3	0,003	0,006	0,009	0,003	0,011
4	0,003	0,006	0,009	0,000	0,009
5	0,000	0,003	0,003	0,003	0,006
6	0,008	0,006	0,014	0,000	0,014
7	0,006	0,000	0,006	0,003	0,009
8	0,003	0,008	0,011	0,003	0,014
9	0,006	0,006	0,012	0,000	0,012
10	0,006	0,003	0,009	0,003	0,012
<i>M</i>	0,005	0,004	0,009	0,002	0,011
<i>m</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Таблиця 2
Результати, отримані при цитогенетичному обстеженні методом FISH осіб з групи II

№	Транслокацій на клітину на геном			Інших аберацій на клітину на геном	Всього аберацій на клітину на геном
	Повні	Неповні	Всього		
1	0,008	0,006	0,014	0,003	0,017
2	0,008	0,003	0,011	0,003	0,014
3	0,011	0,008	0,019	0,003	0,022
4	0,003	0,003	0,006	0,006	0,012
5	0,008	0,017	0,025	0,000	0,025
6	0,006	0,003	0,009	0,000	0,009
7	0,008	0,008	0,016	0,000	0,016
8	0,003	0,008	0,011	0,000	0,011
9	0,006	0,006	0,012	0,000	0,012
10	0,008	0,000	0,008	0,000	0,008
<i>M</i>	0,007	0,006	0,013	0,001	0,014
<i>m</i>	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002

основним типом хромосомних порушень є саме ацентричні фрагменти, а стабільні хромосомні аберації практично не виявляються [23, 24]. Цей феномен підтвердили і результати проведеного нами класичного цитогенетичного обстеження цієї ж групи, згідно з якими частота парних ацентричних фрагментів та атипових моноцентриків (аналогів транслокацій) складала 0,01 та 0,001 на клітину відповідно.

Як видно з даних, наведених в табл. 2, в групі осіб більш старшого віку сумарна частота пов-

них та неповних транслокацій коливалась від 0,006 до 0,025 на клітину на геном, складаючи в середньому $0,013 \pm 0,002$, що дещо перевищувало аналогічний показник в групі I і підтвердило тенденцію щодо зростання спонтанної частоти стабільних аберацій з віком.

Розмах індивідуальних коливань частот повних транслокацій становив 0,003–0,011 на клітину на геном ($0,007 \pm 0,001$ по групі в середньому), неповних — 0–0,017 на клітину на геном ($0,006 \pm 0,002$ по групі в середньому). Група II, як і група I, виявилася неоднорідною щодо переважання окремих типів транслокацій — у 5 осіб домінували повні транслокації, у 2 — неповні, у 3 — їх частоти були ідентичними. По групі в середньому повні транслокації складали 56,7 % від загальної кількості стабільних аберацій. Індивідуальні та середньогрупові частоти ацентричних фрагментів у осіб з групи II були дуже низькі і не відрізнялись від аналогічного показника в групі I, їх внесок у загальну кількість аберацій становив лише 7 %, що ще раз підкреслює недоцільність використання методу FISH для виявлення цього типу аберацій.

Одержані дані в цілому відповідають основним закономірностям спонтанного хромосомного мутагенезу, встановленим в різних країнах світу за допомогою методу FISH і характерним для осіб у віці до та після 50 років: значне переважання стабільних аберацій хромосом над нестабільними, широкий діапазон міжіндивідуальних коливань спонтанної частоти стабільних аберацій у осіб одного віку, тренд до зростання рівня стабільних аберацій з віком.

Слід відзначити, що максимальні та середньогрупові частоти стабільних аберацій в обох обстежених групах дещо перевищували середньопопуляційну вікову норму, встановлену в ряді досліджень, проведених в Росії та країнах дальнього зарубіжжя [5, 6, 11, 13]. Разом з тим наші дані добре узгоджуються з результатами, одержаними Мазнік та ін. [21] для 12 контрольних осіб з України (у віці від 19 до 58 років), які використовували ідентичні нашим флуоресцентні зонди до тих же хромосом — № 1, 2, 4.

Очевидно, для стабільних хромосомних аберацій, як і для нестабільних (на що вказує ряд авторів), неможливо встановити загальний

єдиний контроль для всіх популяцій через нереальність урахування всього комплексу причин, які можуть впливати на цитогенетичні показники [23, 24]. При цьому слід відзначити, що саме при аналізі малих виборок, які використовувалися і в наших дослідженнях, може бути випадкове накопичення індивідів з якимсь неуратованим генотоксичним чи «confounding» фактором, модифікуючим спонтанну частоту хромосомних аберацій. Тому для оцінки можливого впливу різних ендо- та екзогенних факторів на інтенсивність спонтанного соматичного мутагенезу у мешканців України за показником «стабільні хромосомні аберації» необхідно розширення цитогенетичних обстежень неекспонованих груп методом FISH-WCP для створення відповідної бази даних.

Висновки. За допомогою методу FISH-WCP проведено цитогенетичне обстеження двох вікових груп (по 10 чоловіків в середньому віці 23 та 53,5 років відповідно), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами. У всіх обстежених виявлено повні та/чи неповні хромосомні транслокації із значним розмахом коливань їх міжіндивідуальних частот та тенденцією до зростання середньогрупової частоти із віком. Одержані спонтанні рівні стабільних хромосомних аберацій перевищують вікову норму, встановлену для мешканців Росії, Західної Європи та США.

Венозну кров від обстежених осіб було одержано за сприянням полковника Скалецького Ю.М., за що висловлюємо йому подяку.

SUMMARY. FISH-WCP method with fluorescent probes to chromosomes 1, 2, 4 was used for cytogenetical examination of two groups of male (middle age 23 and 53,5 years) who deny their deliberate contact with known or supposed mutagens. The wide inter-individual variability of the stable chromosome aberration frequencies in each group has been shown ($0,006$ – $0,014$ and $0,006$ – $0,025$ per cell per genome-equivalent correspondingly). The trend of increasing of the mean-group level of one-way and two-way translocations during aging has been revealed ($0,009$ and $0,013$ per cell per genome-equivalent, correspondingly).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Edwards A.A. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) // Radiat. Protect. Dosimetry. — 2000. — 88, № 1. — P. 5–6.
2. Bothwell A. M., Whitehouse C.A., Tawn E.J. The application of FISH for chromosome aberration analysis in

- relation to radiation exposure // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 7–14.
3. *Darroudi F., Natarajan A.T.* Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: state of art and current views // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 51–58.
4. *Darroudi F.* Use of FISH translocation analysis for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations? // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 101–109.
5. *Knehr S., Baehlinger M.* Application of FISH painting for dose reconstruction: current status and views of GSF cytogenetics group // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 15–20.
6. *Lindholm C., Salomaa S.* Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 21–26.
7. *Littlefield L.G., McFee A.F., Sayer A.M., O'Neill J.P., Kleinerman R.A., Maor M.H.* Induction and persistence of chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to neutrons in vitro or in vivo: implications of findings in «retrospective» biological dosimetry // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 59.
8. *Lucas J.N., Deng W.* Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 77–86.
9. *Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C., Hone P.* The use of FISH chromosome painting for assessment of old doses of ionising radiation // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 27–34.
10. *Press S., Romm H., Ganguly B.B., Stephan G.* Experience with FISH-detected translocations as an indicator in retrospective dose reconstruction // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 45–50.
11. *Sorokine-Durm I., Durand D., Delbos M. et al.* A French view on FISH painting as a biodosimeter // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 35–44.
12. *Tucker J.D.* Evaluation of chromosome translocations by FISH for radiation biodosimetry: a view from one laboratory // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 87–92.
13. *Воробцова И.Е., Такер Дж.Д., Тимофеева Н.М., Богомазова А.Н. и др.* Влияние возраста и облучения на частоту транслокаций и дицентриков, определяемых методом FISH в лимфоцитах человека // *Радиационная биология. Радиационная экология*. — 2000. — **40**, № 2. — С. 142–148.
14. *Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Mikhailova G.F. et al.* Novel data for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure // *Appl. Radiat. and Isotopes*. — 2000. — № 52. — P. 1149–1152.
15. *Пілінська М.А., Дибський С.С.* Частота хромосомних обменов в критических групах жертв Чорнобильської аварії, виявлені при традиційному цитогенетическому аналізі і з допомогою метода FISH // *Міжнарод. журн. радіац. медицини*. — 2000. — № 1 (5). — С. 83–95.
16. *Пілінська М.А., Дибський С.С.* Частота стабільних хромосомних аберацій, установлені з допомогою метода FISH у 49 ліквідаторів Чорнобильської аварії з різними дозами облучення // *Цитологія і генетика*. — 2001. — **35**, № 4. — С. 50–54.
17. *Burak I.I., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K. et al.* FISH examination of lymphocytes from Mayak workers for assessment of translocation induction rate under chronic radiation exposure // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2001. — **77**, № 8. — P. 901–908.
18. *Nakano M., Kodama Y., Ohtaki K., Itoh M. et al.* Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2001. — **77**, № 8. — P. 97–977.
19. *Пілінська М.А., Дибський С.С.* FISH versus EPR dosimetry in Chernobyl liquidators // *Доп. НАН України*. — 2001. — № 2. — С. 185–189.
20. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Скалецький Ю.М.* Використання метода FISH для верифікації доз опромінення у ліквідаторів Чорнобильської аварії // *Цитологія і генетика*. — 2002. — **36**, № 5. — С. 16.
21. *Мазник Н.А., Винников В.А.* Уровень аберацій хромосом в лимфоцитах периферической крови у эвакуантов из 30-километровой зоны ЧАЭС и жителей радиационно загрязненных территорий в отдаленные сроки после Чорнобильской аварії // *Радиационная биология. Радиационная экология*. — 2002. — **42**, № 6. — С. 704–710.
22. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Педан Л.Р.* Цитогенетичне обстеження учасників ліквідації наслідків Чорнобильської аварії за допомогою традиційного цитогенетичного аналізу та методу флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) // *Журн. АМН України*. — 2003. — **9**, № 3. — С. 465–475.
23. *Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И.* База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных аберацій в культуре лимфоцитов периферической крови человека // *Вестн. Рос. академии мед. наук*. — 2001. — № 2. — С. 21–29.
24. *Чеботарев А.Н.* Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // *Вестн. Рос. академии мед. наук*. — 2001. — № 10. — С. 64–69.
25. *Sorokine-Durm I., Whitehouse C.A., Edwards A.A.* The variability of translocation yields amongst control populations // *Radiat. Protect. Dosimetry*. — 2000. — **88**, № 1. — P. 93–100.
26. *Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A. et al.* A proposed system for scoring structural aberrations detecting by chromosome painting // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — **68**. — P. 211–221.
27. *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.

Надійшла 28.12.03