

М.А. ПІЛІНСЬКА, С.С. ДИБСЬКИЙ,  
О.В. ШЕМЕТУН, О.О. ТАЛАН

Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ

# **РІВЕНЬ СПОНТАННИХ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ У ДІТЕЙ З ЕКОЛОГІЧНО ЧИСТОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ, ВСТАНОВЛЕНИЙ ПРИ ЦИТОГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ РІВНОМІРНО ТА ДИФЕРЕНЦІЙНО ЗАБАРВЛЕНИХ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ**



*З використанням рівномірного та диференційного G-забарвлення встановлено частоту аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові дітей з Львівської області України, які народились після Чорнобильської катастрофи.*

© М.А. ПІЛІНСЬКА, С.С. ДИБСЬКИЙ, О.В. ШЕМЕТУН,  
О.О. ТАЛАН, 2004

**Вступ.** Частота спонтанних хромосомних аберацій є важливою кількісною характеристикою соматичного мутагенезу [1–6]. Дані щодо рівня хромосомних аберацій в неекспонованих групах людей вважаються базовими під час оцінки цитогенетичного ефекту, індукованого виробничими чи екологічними мутагенами. Провідними цитогенетичними лабораторіями світу встановлено ряд певних закономірностей спонтанного хромосомного мутагенезу в соматичних клітинах людини. Більшість результатів досліджень (спеціальних чи накопичених при обстеженні контрольних груп) отримані за допомогою аналізу рівномірно забарвлених хромосом (в останні роки — з використанням методу FISH) та узагальнені в оглядових публікаціях [4–8]. Найвагомішими серед них є дані одних і тих самих груп дослідників з практично однаковими критеріями цитогенетичного аналізу, що дозволяє запобігти впливу суб'єктивних факторів на результати досліджень [5]. В Науковому центрі радіаційної медицини АМНУ при цитогенетичному обстеженні 1127 осіб, які контактували з різними мутагенними факторами, був проведений цитогенетичний аналіз метафазних хромосом лімфоцитів периферичної крові у 149 контрольних індивідів віком від 14 до 45 років [6]. Показано, що в контрольній групі середня частота аберацій складала 1,47 на 100 метафаз і позитивно корелювала з віком обстежених осіб. Серед робіт з дослідження спонтанного мутаційного процесу в популяції найбільш фундаментальною є стаття Н.П. Бочкова зі співавт. [4], в якій наведено результати майже тридцятирічного вивчення спонтанного рівня хромосомних аберацій в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Отримані дані представлені у вигляді бази даних, до якої включені відомості щодо 1172 осіб віком від 0 до 84 років. При виконанні роботи було проаналізовано 318 382 метафаз і встановлено, що частота абераційних метафаз в контрольній групі в цілому складала  $2,13 \pm 0,085$  на 100 клітин (з розмахом індивідуальних коливань від 0 до 9,68 на 100 клітин). Показано відсутність різниці за загальною частотою хромосомних аберацій та за окремими типами пошкоджень хромосом між особами жіночої та чоловічої статі. Не виявлено змін загальної частоти хромосомних аберацій залежно від віку, проте у осіб старших вікових груп зареєстровано зростання кількості фрагментів і зниження

рівня обмінів. Останнє протирічить результатам досліджень, виконаних з використанням більш сучасного молекулярно-цитогенетичного методу флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), що показали зростання частоти хромосомних транслокацій з віком [7–10].

Значно менша кількість робіт присвячена вивченню закономірностей спонтанного хромосомного мутагенезу за допомогою аналізу диференційно G-забарвлених метафазних хромосом. Це обумовлено трудомісткістю методу, хоча саме він вважається «золотим стандартом» для встановлення рівнів всіх типів хромосомних аберацій [11]. Серед таких досліджень найбільш скрупульозною залишається робота Kazuo Othaki [12], де наведені дані щодо частоти нестабільних та стабільних хромосомних аберацій в неекспонованій групі з 11 чоловік (проаналізовано 1487 метафаз), що була контрольною при оцінці цитогенетичного ефекту у осіб, які пережили атомне бомбардування в Хіросімі. Показано, що середньогрупова частота всіх типів аберацій складала  $3,25 \pm 1,77$  на 100 клітин, 43 % з яких були представлені хромосомними транслокаціями, 22 % — термінальними делеціями.

**Результати цитогенетичного обстеження дітей Львівської області, отримані при паралельному використанні рівномірного та G-диференційного забарвлень хромосом**

| Тип пошкодження                                                 | Частота на 100 клітин  |                            | P       |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------|
|                                                                 | Рівномірне забарвлення | G-диференційне забарвлення |         |
| Аберантні клітини                                               | $1,20 \pm 0,09$        | $1,64 \pm 0,29$            | $>0,05$ |
| Аберації хромосом                                               | $1,25 \pm 0,10$        | $1,74 \pm 0,30$            | $>0,05$ |
| Хроматидного типу                                               | $0,80 \pm 0,09$        | $0,56 \pm 0,17$            | $>0,05$ |
| Хромосомного типу                                               | $0,40 \pm 0,07$        | $1,18 \pm 0,24$            | $<0,01$ |
| дицентричні хромосоми                                           | $0,00 \pm 0,00$        | $0,05 \pm 0,05$            | —       |
| аномальні моноцентрики * (транс- (транслокації та інверсії **)) | $0,01 \pm 0,01$        | $0,26 \pm 0,11$            | $<0,05$ |
| парні фрагменти * (хромосомні делеції **)                       | $0,39 \pm 0,07$        | $0,87 \pm 0,21$            | $<0,05$ |

\* Рівномірне забарвлення. \*\* G-диференційне забарвлення.

Виходячи з вищезазначеного, ми визнали за доцільне привести порівняльні результати цитогенетичного обстеження дітей, які мешкали у екологічно чистому Львівському регіоні України, виконаного з використанням традиційного та G-banding аналізів хромосом лімфоцитів периферичної крові.

**Матеріал та методика.** Обстежено 21 особу віком від 12 до 16 років, які народилися після Чорнобильської катастрофи та мешкали у Львівській області на місцевості, ендемічній за зобом і не забрудненій радіоізотопами цезію. Матеріалом цитогенетичного дослідження були лімфоцити периферичної крові, що культивувались за загальноприйнятим напівмікрометодом Hungerford [13]. Фарбування рутинних препаратів проводили 2%-ним розчином барвника Гімза («Merk», Німеччина), приготованим на фосфатному буфері (pH 6,8). Диференційне G-забарвлення виконували з використанням трипсину згідно з методом Seabright [14]. Аналіз препаратів здійснювали з візуальним груповим (при рівномірному забарвленні хромосом) та індивідуальним (при диференційному забарвленні хромосом) каріотипуванням під мікроскопами AxioPlan та Axioscope (Німеччина) зі збільшенням  $\times 1000$ . Реєстрували всі аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти) і хромосомного (парні ацентричні фрагменти, дицентричні хромосоми, транслокації, інверсії, інсерції) типів. При G-banding аналізі одиначні фрагменти відповідали хроматидним розривам, парні фрагменти — термінальним та інтерстиціальним делеціям (делятованим хромосомам). Під час аналізу диференційно забарвлених препаратів реєстрували номер пошкодженої хромосоми та точки розривів згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-1995 [15]. Від кожного обстеженого, як правило, аналізували по 500 рутинно та 100 диференційно пофарбованих метафазних пластинок, що відповідали необхідним вимогам [16]. Отримані дані опрацьовані з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати цитогенетичного обстеження дітей з екологічно чистого регіону Львівської області, отримані з використанням рівномірного та диференційного G-забарвлення метафазних хромосом, представлено в таблиці.

Як видно з наведених даних, при рівномірному забарвленні препаратів встановлено відповідність виявленого цитогенетичного ефекту віковим показникам спонтанного хромосомного мутагенезу: середньогрупові частота аберацій хромосом становили  $1,20 \pm 0,09$  та  $1,25 \pm 0,10$  % на 100 метафаз відповідно; в жодному випадку рівень метафаз з абераціями не перевищував 2 % і коливався від 0,40 до 1,80 %; на одну абераційну метафазу припадало 1,04 аберацій; практично в усіх обстежених зустрічалися лише прості аберації хроматидного та хромосомного типу (одиначні та парні ацентричні фрагменти), тільки в одному випадку виявлено транслоковану хромосому (аномальний моноцентрик), але частота стабільних аберацій по групі в середньому ( $0,01 \pm 0,01$  на 100 клітин) не перевищувала відповідний середньопопуляційний показник; співвідношення між абераціями хроматидного та хромосомного типу дорівнювало 2 : 1.

Слід зазначити, що частота аберацій, зареєстрована у дітей з Львівської області з використанням рівномірного забарвлення хромосом, істотно не відрізнялась від даних, отриманих нами під час цитогенетичного обстеження контрольних груп відповідного віку як до, так і після Чорнобильської аварії ( $1,78 \pm 0,20$  на 100 метафаз та  $1,47 \pm 0,24$  на 100 метафаз відповідно) в 70–90-х роках минулого століття [17, 18]. Це дещо протирічить думці Бочкова [19] про прискорення темпів спонтанного хромосомного соматичного мутагенезу в наш час за рахунок дії мутагенів довкілля.

При аналізі диференційно G-забарвлених хромосом середньогрупові частота аберацій метафаз та загальний рівень аберацій складали  $1,64 \pm 0,29$  (з розкидом індивідуальних коливань від 0 до 3 %) та  $1,74 \pm 0,30$  % на 100 метафаз відповідно; на одну абераційну клітину припадало 1,06 хромосомних порушень, що не відрізнялось від показників, одержаних при традиційному цитогенетичному аналізі. Разом з тим істотно змінилися спектр та співвідношення аберацій: підвищилась частота аберацій хромосомного типу, які складали 72 % усіх пошкоджень хромосом і були представлені термінальними та інтерстиціальними делеціями ( $0,87 \pm 0,21$  на 100 метафаз), транслокаціями й інверсіями ( $0,26 \pm 0,11$  на 100 метафаз) та

дицентриками ( $0,05 \pm 0,05$  на 100 метафаз). Середньогрупові частоти окремих типів аберацій хромосомного типу перевищували дані, отримані при аналізі рівномірно забарвлених хромосом ( $p < 0,05$ ), але відповідали віковій нормі.

Аналіз пошкоджуваності окремих бендів показав, що переважна більшість всіх розривів локалізувалась в еухроматинових районах хромосом.

Наведені результати цитогенетичного аналізу лімфоцитів периферичної крові дітей з Львівської області підтвердили дані наших попередніх досліджень з паралельним використанням рівномірного та G-диференційного забарвлення хромосом, отримані при обстеженні дорослих киян та осіб, які зазнали гострого чи хронічного опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС, щодо кращого виявлення деяких типів аберацій (делеції та транслокації) при застосуванні диференційного G-забарвлення [20–22].

**Висновки.** Цитогенетичне обстеження дітей віком від 12 до 16 років, які народилися після Чорнобильської катастрофи та мешкали у Львівській області на незабрудненій радіонуклідами місцевості, встановило відповідність зареєстрованого рівня аберацій показникам спонтанного хромосомного мутагенезу для даної вікової категорії. Прискорення темпів спонтанного хромосомного соматичного мутагенезу після аварії на Чорнобильській АЕС в даному регіоні України не відзначено. Обидва методи фарбування хромосом, використані в цитогенетичному дослідженні (рівномірне та G-диференційне), засвідчили відсутність впливу мутагенних чинників на обстежених осіб, що підтверджує дані про екологічне благополуччя регіону їх проживання. Показано, що використання диференційного G-забарвлення хромосом сприяло підвищенню точності цитогенетичного аналізу. Наведені результати можуть бути використані як контрольні для даної вікової групи при оцінці можливого мутагенного пресингу факторів зовнішнього середовища на людину.

**SUMMARY.** The frequency of chromosome aberrations in children from Lviv region of Ukraine born after Chernobyl accident have been determined using conventional and G-banding staining.

**РЕЗЮМЕ.** С использованием равномерного и дифференциального G-окрашивания хромосом определена частота хромосомных aberrаций у детей Львовской области Украины, рожденных после Чернобыльской катастрофы.

# СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бочков Н.П., Катосова Л.Д., Платонова В.И. и др. Неоднородность контрольных выборок как причина дополнительных вариаций спонтанного уровня хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов человека // Генетика. — 1994. — 30, № 5. — С. 463–466.
2. Бочков Н.П., Попова Н.А., Катосова Л.Д. и др. Необычайно высокий уровень хромосомной изменчивости в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. — 1999. — 35, № 6. — С. 838–841.
3. Stephan G., Pressl S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division // Mutat. Res. — 1999. — № 446. — P. 231–237.
4. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Вестн. РАМН. — 2001. — 37, № 2. — С. 21–29.
5. Чеботарев А.Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // Вестн. РАМН. — 2001. — 37, № 10. — С. 64–69.
6. Пилинская М.А., Шеметун А.М., Дибский С.С. и др. Выявление мультиабберантных лимфоцитов при цитогенетическом обследовании различных групп людей, контактирующих с мутагенными факторами // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 1. — С. 27–32.
7. Sorokine-Durm I., Whitehouse C.A., Edwards A.A. The variability of translocation yields amongst control populations // Radiat. Protect. Dosim. — 2000. — 88, № 1. — P. 93–100.
8. Мазник Н.О. Стабільні aberrції хромосом як довгостроковий маркер радіаційного впливу // Укр. радіол. журн. — 2003. — 11, вип. 1. — С. 106–114.
9. Воробцова И.Е., Такер Дж.Д., Тимофеева Н.М., Богомазова А.Н. и др. Влияние возраста и облучения на частоту транслокаций и дисцентриков, определяемых методом FISH в лимфоцитах человека // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2000. — 40, № 2. — С. 142–148.
10. Пілінська М.А., Дибський С.С. Спонтанний рівень aberrаций хромосом, встановлений в лимфоцитах периферичної крові осіб різного віку за допомогою методу FISH // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 4. — С. 62–66.
11. Tanaka K., Popp S., Fisher C. et al. Chromosome aberration analysis in atomik bomb survivors and thorostrast patients using two- and three-colour chromosome painting of chromosomal subsets // Int. J. Radiat. Biol. — 1996. — 70, № 1. — P. 95–108.
12. Kazuo Othaki. G-banding analysis of radiation-induced chromosome damage in lymphocytes of Hiroshima A-bomb survivors // Japan J. Human Genet. — 1992. — 37. — P. 245–262.
13. Hungerford D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. — 1965. — 10. — P. 333–338.
14. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // Lancet. — 1971. — 2. — P. 971–972.
15. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (1995) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. — Basel : Karger, 1995. — P. 5–21.
16. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека : Атлас. — М.: Медицина, 1982. — 263 с.
17. Пилинская М.А., Журков В.С. Частота aberrаций хромосом у детей, проживаючих в районах с различным расходом пестицидов // Генетика. — 1977. — 13, № 1. — С. 158–161.
18. Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Знаєвська І.А. Цитогенетичний ефект в лимфоцитах периферичної крові дітей, що мешкають в деяких населених пунктах Овруцького району Житомирської області України, забруднених радіонуклідами // Цитология и генетика. — 1992. — 26, № 4. — С. 10–14.
19. Бочков Н.П., Катосова Л.Д. Генетический мониторинг популяций человека при реальных химических и радиационных нагрузках // Вестн. РАМН. — 1992. — № 4. — С. 10–14.
20. Пилинская М.А., Шеметун Е.В., Шеметун А.М. Радиоиндуцированные цитогенетические маркеры, обнаруженные через 8 лет после аварии на ЧАЭС при различных способах анализа препаратов метафазных хромосом у лиц, перенесших острую лучевую болезнь // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 5. — С. 3–11.
21. Шеметун О.В., Пілінська М.А. Виявлення стабільних та нестабільних маркерів радіаційної дії у осіб, що зазнають хронічного опромінення, за допомогою методів рутинного та диференційного забарвлення метафазних хромосом // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 1. — С. 32–37.
22. Шеметун О.В. Частота хромосомних aberrаций в післячорнобильський період у осіб, які мешкають у місті Києві // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 1. — С. 37–42.

Надійшла 28.07.04