

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

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

Институт радиационной безопасности и экологии НЯЦ РК

laurakenzhina@nnc.kz

Резюме: 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 системы 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, транслокация, лимфоциты периферической венозной крови.

1. 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].

Для проведения 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* [4]. 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 [5].

Расчёт 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.

2. Материалы и методы 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).

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

После получения информированного согласия проведено анкетирование, на основании чего не было отмечено повышенного или хронического воздействия факторов, которые могут повлиять на частоту хромосомных aberrаций, 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 1мл 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.

Культуральная среда RPMI-1640 с глутамином содержала 15% эмбриональной телячьей сыворотки, 2,5% фитогемагглютинина, антибиотики 10000 мкг/мл, 0,5 мл периферической крови. Инкубацию клеточной культуры проводили при 37 °С в позиции 45 градусов, для лучшей агрегации лимфоцитов, в течение 48 часов. Для блокирования первого митоза на стадии метафазы за 3 часа до окончания культивирования во флаконы с культурой клеток добавляли раствор колхицина в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. По окончании культивирования содержимое флаконов тщательно перемешивали и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеток. Для получения цитогенетических препаратов клетки гипотонизировали 0,075М KCL при 37 °С 10 мин. Фиксировали смесью этиловый спирт/ледяная уксусная кислота (3:1). Для получения препаратов метафазных хромосом клетки ресуспендировали в фиксаторе с помощью пастеровской пипетки, наносили 50 мкл клеточной суспензии на охлажденное влажное предметное стекло и высушивали на термоплате при $t = 45 - 48^{\circ} \text{C}$.

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% [Morton60]. Высушенные препараты фиксировали в холодном этаноле 70%, 90%, 100% по 2 минуты в каждом. В темном помещении раскапывалось дозатором на стекло 25 мкл гибридизационной смеси. Закрывали покровным стеклом, заклеивали клеем.

Денатурация и Гибридизация. Цитогенетические препараты ставили в термобрайтер с программой денатурации при $t = 75^{\circ} \text{C}$ - 2 минуты, гибридизация происходила до 90 часов и более при $t = 37^{\circ} \text{C}$. Постгибридизационную отмывку производили 0,4×SSC с Tween 20 в течение 2 минут, в 2×SSC - 5 минут при $t = 75^{\circ} \text{C}$, в 0,4×SSC -5 минут при комнатной температуре. 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 .

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.

3. Результаты исследования

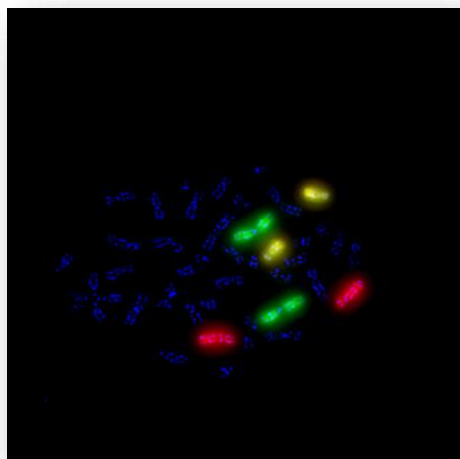
Результаты распределения фоновой частоты транслокаций в различных возрастных стратах представлены в таблице 2.

Таблица 2. Возрастная динамика распределения стабильных aberrаций

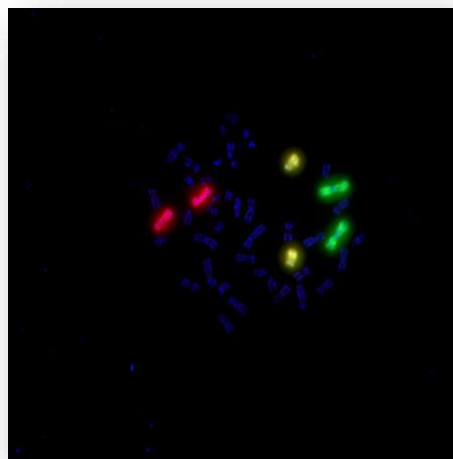
ИРБЭ (Казахстан)					NRPB (Украина)	BFS (Германия)	IRSN (Франция)
Возрастная группа	Кол-во человек	Кол-во проанализ. клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток	Частота транслокаций на 1000 клеток
20-29	7	12711	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				

Как видно из таблицы, частота стабильных хромосомных aberrаций, 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 aberrаций в норме и патологии у исследуемых групп представлены на рисунке 1.



а)



б)

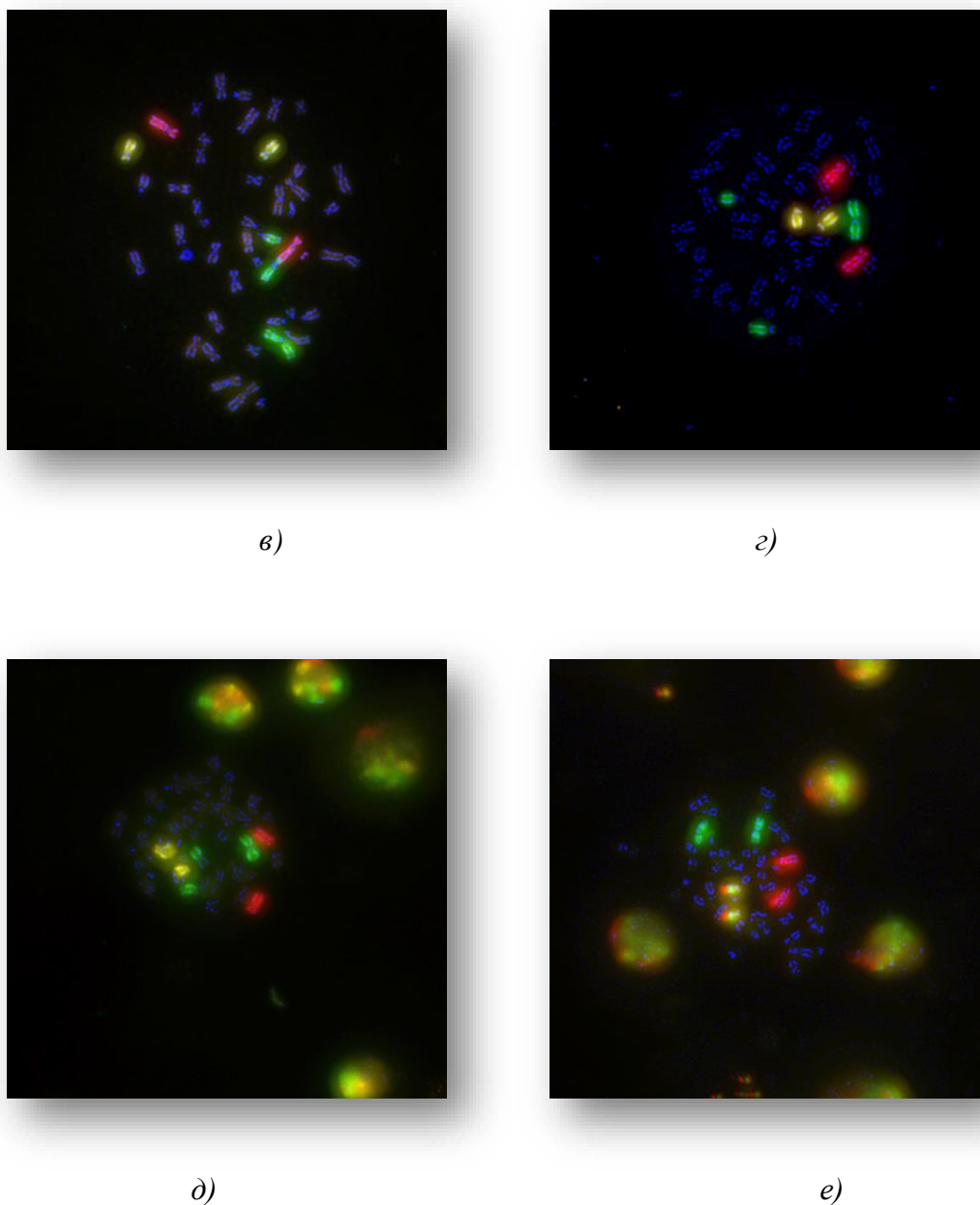


Рис. 1. Стабильные хромосомные aberrации методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в норме (а, б) в патологии у исследуемых групп (в, г), в группе курящих (д, е).

Влияние вредных привычек, таких как курение, является наиболее исследуемым признаком, оказывающим влияние на уровень транслокаций [7], поэтому была проведена корреляция между уровнем стабильных хромосомных повреждений и этой вредной привычкой в исследуемых возрастных группах, результаты представлены в таблице 3.

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

Возрастная группа	Кол-во человек	Курящие			Кол-во человек	Не курящие		
		Кол-во проанализированных клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000кл		Кол-во проанализированных клеток	Кол-во транслокаций	Частота транслокаций на 1000кл
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	

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.

4. Заключение

Выявленная стандартная частота стабильных транслокаций при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) имеет выраженную индивидуальную вариабельность и варьирует от 0,97±0,3 до 6,37±1,4 на 100 клеток, что соответствует фоновым значениям. Таким образом, частота спонтанного уровня стабильных хромосомных aberrаций необходима в практической радиобиологии для проведения корректной ретроспективной биодозиметрии в отдаленные сроки после облучения с учетом возраста, пола, вредных привычек, таких как курение. Данный параметр важен в обозначении «нулевой точки» дозы при построении собственной калибровочной кривой «доза - эффект».

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). - 119-122.
3. Использование цитогенетической дозиметрии для обеспечения готовности и реагирования при радиационных аварийных ситуациях. Международное агентство по атомной энергии. – Вена. - 2014.

4. Cho MS, Lee JK, Bae KS et al. Retrospective biodosimetry using translocation frequency in a stable cell of occupationally exposed to ionizing radiation. // J Radiat Res. – 2015. - №56 (4). – P.709-716
5. Beinke C, Meineke V. High potential for methodical improvements of FISH-based translocation analysis for retrospective radiation biodosimetry. // Health Phys. - 2012. -№103 (2). – P.27-32
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. I. Sorokine-Durm, C. Whitehouse and A. Edwards. The variability of translocation yields amongst control populations. // Radiation Protection Dosimetry. – 2000. - Vol. 88. - No. 1, P. 93–99

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

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

Abstract: 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, translocation, lymphocytes of peripheral black blood.

**SEMİPALATİNSK TEST ZONASINA YAXIN ƏRAZİDƏ YAŞAYAN ƏHALİ
ARASINDA SABİT TRANSLOKASIYALARIN REGIONAL FON TEZLİYİNİN
MÜƏYYƏN EDİLMƏSİ**

L.B. Kenjina, A.N. Mamırbayeva, A.O. Kenesarina

Xülasə: Məqalədə 1000 hüceyrə üçün 1.42 ± 0.3 və 4.9 ± 0.5 arasında dəyişən müxtəlif yaş qruplarında *in situ* floresan hibridizasiyadan istifadə edərək sabit translokasyonların regional fon tezliyinin nəticələri göstərilib. FISH-texnika tərəfindən aşkarlanan sabit xromosom aberasiyasının tezliyinin yaşla artdığı aşkar olunmuşdur. Bu, əsasən, yaşla birlikdə, DNA-nın bərpası və bərpa proseslərini yavaşladan, xromosomal aparatın sabitliyində mütərəqqi bir azalma olması ilə bağlıdır. Siqaret kimi pis vərdişlərin təsirləri translokasiya səviyyəsinə təsir edən ən çox öyrənilən əlamətdir; buna görə sabit xromosom ziyanının səviyyəsi və bu yaş qruplarına aid olan bu pis vərdiş arasında korrelyasiya olmuşdur. Stabil xromosom ziyanının fon tezliyi elektron Carl Zeiss AxioImager Z2 floresan mikroskop, avtomatik Metafer 4/M

Search, ISIS (MetaSystems, Almaniya) metafaz axtarış və analiz sisteminə əsaslanan avtomatlaşdırılmış sitogenetik platforma avadanlıqları vasitəsi ilə və 1, 4, 12 xromosomları üçün kommersiya xromosomal DNT problemlərində istifadə edərək hesablanmışdır.

Açar sözlər: in-situ (yerində) fluoresan hibridizasiya, sabit xromosomal aberasyonlar, translokasiya, periferik venoz qan lenfositləri.