

КОНТРОЛЬНЫЕ УРОВНИ ТРАНСЛОКАЦИЙ В КУЛЬТУРАХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ТРЕХЦВЕТНОГО FISH-ОКРАШИВАНИЯ

© 2024 г. Е. Е. Ломоносова, В. Ю. Нугис*, М. Г. Козлова, В. А. Никитина

Государственный научный центр Российской Федерации –
Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, Россия

*E-mail: nugisvju@list.ru

Поступила в редакцию 7.02.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 11.09.2024 г.

Представлены результаты использования трехцветного FISH-окрашивания хромосом (ДНК-пробы к 1, 4 и 12 парам хромосом) для исследования контрольного уровня транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови 35 относительно здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 21 года до 72 лет. Такие сведения необходимы для ретроспективного установления как самого факта переоблучения, так и для адекватной оценки полученной дозы. Основную массу регистрируемых окрашенных перестроек составили транслокации, частота которых существенно в 3,3 раза превышала уровень нестабильных aberrаций (дидентрики и ацентрики). При этом наблюдалась корреляционная зависимость умеренной силы уровня FISH-транслокаций от возраста доноров, а пол никак не сказывался на этом показателе. Также не было обнаружено существенного влияния различных видов медицинского диагностического облучения, курения и заболевания новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на исследуемый индекс повреждения хромосом. В целом обнаруженные частоты транслокаций в геном-эквивалентных клетках в их связи с возрастом достаточно хорошо согласовывались с результатами международных исследований.

Ключевые слова: культура лимфоцитов периферической крови, контрольная группа, трехцветный FISH-метод, транслокации, ретроспективная оценка дозы

DOI: 10.31857/S0869803124060031, **EDN:** NDMOFF

В настоящее время в рамках биологической индикации дозы для ее ретроспективной оценки рекомендуется использование FISH-окрашивания хромосом культивируемых лимфоцитов периферической крови с помощью цельнохромосомных ДНК-зондов [1]. Для этого необходимо получить как кривые доза–эффект для транслокаций, построенные по результатам облучения крови *in vitro*, так и иметь представление о фоновых уровнях этих перестроек хромосом в контрольных группах. Действительно, для получения калибровочных зависимостей обычно используют кровь трех-пяти доноров. Возможные же колебания величин фоновых уровней у разных людей и влияние на них других факторов (возраст, курение и т.п.) требует отдельных исследований. Такие вариации могут оказывать влияние как на само установление факта переоблучения, так и на адекватную оценку полученной дозы. Обзор научных данных о фоновых уровнях FISH-ре-

гистрируемых транслокаций был сделан нами в статье [2].

Для ретроспективной оценки дозы также были получены уравнения дозовых зависимостей для транслокаций, идентифицируемых с помощью трехцветного FISH-окрашивания [3]. При этом для сравнения использовали ДНК-зонды к 1, 4 и 12 и к 2, 3 и 8 парам хромосом. Было показано отсутствие существенных различий между зависимостями, полученными с разными наборами ДНК-проб. Учитывая это, в настоящей статье были решено оценить контрольные значения FISH-регистрируемых перестроек хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови доноров-добровольцев с использованием набора ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом.

Необходимо отметить, что для практических целей биологической индикации дозы от слу-

чайного облучения наибольшее значение имеет знание величин не спонтанной частоты повреждений хромосом и даже не фоновых значений, а именно их контрольного уровня. Здесь под фоновой частотой подразумевается величина частоты аберраций хромосом, индуцируемых только естественными источниками ионизирующих излучений. Контрольные же величины для какого-либо контингента или популяции могут иметь составляющей, например, последствия воздействия широко распространенных источников медицинского характера, избежать влияния которых оказывается очень сложно, и они становятся реальной составляющей общего фона, как от естественных, так и искусственных источников радиации без возникновения аварийной ситуации.

В работе [4], посвященной сравнению контрольных цитогенетических данных, полученных при классической окраске хромосом разными отечественными лабораториями, при отборе доноров следовали следующим критериям: 1) отсутствие в течение всей жизни профессионального или аварийного контакта с ионизирующей радиацией; 2) отсутствие в течение ближайших 5 лет до исследования лучевой или химиотерапии и значимых диагностических процедур с использованием любых радиационных источников; 3) проживание на территориях, не отнесенных к экологически неблагоприятным по действию любого фактора. При этом допускается наличие плановых рентгенологических обследований [5]. Более того, в работе Sorokine-Durm et al. (2000) говорится, что радиационная авария вообще может быть связана с людьми, которые ранее подвергались профессиональному воздействию радиации или других генотоксичных агентов, и поэтому единственной информацией, которую важно знать относительно контрольных субъектов, является их возраст и привычка к курению [6].

В целом в настоящей работе при отборе обследуемого контингента исходили из критериев, задекларированных в статьях [4, 5]. Но, так как в данной статье речь идет в основном о таких стабильных перестройках, как транслокации, то поэтому исключались лица, подвергавшиеся терапевтическому (но не диагностическому) медицинскому радиационному воздействию; жители загрязненных территорий; работники, участвовавшие в дезактивационных мероприятиях или подвергавшиеся другому профессиональному облучению в независимости от сроков, когда эти события имели место быть.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для данных цитогенетических исследований послужила кровь, полученная из кубитальной вены 35 относительно здоровых доноров. В эту группу вошли как люди, специально отобранные для данного исследования, так и три человека, кровь которых использовалась в экспериментах с ее облучением *in vitro* [3]. В общей сложности хромосомный анализ был проведен у 21 женщины и 14 мужчин в возрасте от 24 до 72 лет и от 21 до 47 лет соответственно (все – русские). Забор крови производили в пластиковые пробирки для взятия крови BD Vacutainer объемом 10 мл с гепарином лития (“Becton Dickinson”, США).

Перед венопункцией все доноры подписали добровольное информированное согласие, в котором были разъяснены цели исследования и объяснены возможные риски и неудобства, связанные с участием в нем, разъяснено, как будет использована полученная информация.

Также все доноры-добровольцы заполнили “Персональный медицинский опросник” для фиксации сведений по некоторым моментам профессиональной деятельности, осуществленным медицинским рентгеновским процедурам, перенесенным до взятия крови инфекционным болезням, и отношения обследованных лиц к курению. Отметим, что в данном опроснике отсутствовали вопросы о потреблении алкоголя в связи с ограниченной возможностью, с нашей точки зрения, получения честных ответов. Кроме того, существенное влияние алкоголя на уровень аберраций хромосом по данным научной литературы наблюдалось только у хронических алкоголиков (см. обзор [2]), каковые в обследованной нами группе отсутствовали. В табл.1 приведены некоторые данные, полученные из этих персональных медицинских опросников.

Все проведенные процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение данного исследования было одобрено этическим комитетом при ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (протокол № 41 от 15 февраля 2021 г.).

Для анализа аберраций хромосом был использован трехцветный FISH-метод с набором ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом.

Таблица 1. Сведения, полученные из персональных медицинских опросников и касающиеся медицинских рентгеновских процедур и инфекционных болезней, перенесенных донорами до взятия у них крови, и их отношения к курению

Table 1. Information obtained from personal health questionnaires regarding medical X-ray procedures and infectious diseases experienced by donors prior to blood collection and their attitudes towards smoking

№ п/п	Ф.И.О.	Пол	Возраст, лет	Перенесенный COVID-19	ОРВИ	Куре- ние	Медицинская рентгенодиагностика		
							стоматология: когда	ежегодная флюорография	разная локализация (когда)
1	А.Т.А.	ж	47	нет	нет	нет	свыше 1 года назад	да	нет
2	Ж.А.С.	м	21	нет	нет	нет	нет	нет	нет
3	К.И.В.	ж	38	нет	нет	раньше	в последние 6—12 мес.	нет	нет
4	М.Б.И	м	26	нет	нет	нет	нет	нет	нет
5	Б.В.А.	м	28	нет	нет	раньше	в последние 6 мес.	да	нет
6	Б.Т.М.	ж	33	да	нет	нет	в последние 6—12 мес.	нет	КТ почки (2020)
7	З.А.Ю.	м	45	нет	нет	раньше	свыше 1 года назад	нет	легкие (2019)
8	К.М.Г.	ж	60	нет	нет	нет	нет	да	нет
9	К.С.В.	ж	27	нет	нет	нет	свыше 1 года назад	нет	нет
10	К.Т.В.	ж	34	нет	нет	да	нет	да	колени (4 раза за 10 лет)
11	К-в С.В.	м	29	да	нет	нет	нет	нет	КТ легких
12	Л.Е.Е.	ж	31	нет	нет	нет	свыше 1 года назад	нет	нет
13	Н.В.А.	ж	47	нет	нет	сейчас	свыше 1 года назад	да	нет
14	Н.О.В.	ж	34	да	нет	нет	нет	нет	голеностопный сустав (2020)
15	О.А.С.	м	47	да	да	раньше	свыше 1 года назад	да	нет
16	Р.А.А.	ж	24	да	да	раньше	свыше 1 года назад	нет	легкие (2014)
17	Б.Н.И.	ж	72	да	нет	нет	нет	да	нет
18	Б.Г.П.	ж	68	нет	нет	нет	свыше 1 года назад	да	КТ легких (2018, 2019, 2020)
19	У.Д.Ю.	ж	27	да	да	раньше	в последние 6—12 мес.	нет	КТ головы, рентген шей (2022)
20	Г.А.А.	м	39	нет	нет	раньше	свыше 1 года назад	нет	грудная клетка (2020)

Таблица 1. Окончание

№ п/п	Ф.И.О.	Пол	Возраст, лет	Перенесенный COVID-19	ОРВИ	Куре- ние	Медицинская рентгенодиагностика		
							стоматология: когда	ежегодная флюорография	разная локализация (когда)
21	Г.И.А.	ж	38	нет	нет	нет	в последние 6–12 мес.	нет	грудная клетка (2022)
22	С.Н.В.	ж	51	да	нет	раньше	в последние 6 мес.	да	нет
23	С.Ю.Б.	ж	39	нет	нет	сейчас	свыше 1 года назад	да	грудная клетка (2017)
24	Ф.Ю.А.	м	36	нет	нет	нет	в последние 6–12 мес.	нет	панорама ребер (2022)
25	П.Е.В.1	ж	46	нет	да	нет	в последние 6 мес.	да	нет
26	Б.В.В.	м	30	да	нет	нет	в последние 6–12 мес.	нет	нет
27	Е.В.О.	ж	29	да	нет	нет	нет	нет	нет
28	Ж.А.М.	м	28	нет	нет	нет	нет	нет	нет
29	И.С.М.	ж	24	да	да	нет	в последний месяц	да	нет
30	К.А.М.	м	45	нет	да	нет	свыше 1 года назад	нет	нет
31	П.Т.В.	ж	38	нет	да	сейчас	в последние 6 мес.	нет	легкие (2020), нос (2021)
32	П.Е.В.2	ж	53	да	нет	нет	нет	нет	молочная железа (2023)
33	О.В.А.	м	41	нет	нет	нет	нет	нет	нет
34	Ш.Е.Г.	м	36	нет	нет	нет	нет	нет	нет
35	Т.Е.Н.	ж	28	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Примечание. В графах COVID-19 и ОРВИ “да” означает заболевание в течение последних 12 мес. перед взятием крови. В графе курение: “нет” — никогда не курил, “раньше” — курил раньше (от 2 до 16 лет назад), “сейчас” — курит в настоящее время.

Методики постановки культур лимфоцитов периферической крови, приготовления препаратов хромосом, их FISH-окрашивания, критерии цитогенетического анализа с использованием системы “Метафер 4” (“MetaSystems”, Германия) описаны в статьях [3, 7]. Имеет смысл напомнить, что, как и при цитогенетическом анализе в отдаленные сроки после облучения культур лимфоцитов периферической крови одного из пациентов, пострадавшего при аварии на Чернобыльской АЭС, абберрации хромосом подсчитывали только в метафазах с почти диплоидным набором хромосом (40–46) и визуально полным составом всех FISH-окрашенных участков, т.е. изначально исключался учет FISH-идентифицируемых делеций [8]. Такой подход основан на данных работы [9], в которой было показано отсутствие статистически существенных различий в частотах транслокаций при анализе метафаз только с 46 центромерами и с 38–46 центромерами. Количества полных и неполных транслокаций были суммированы.

Статистическую обработку данных (сравнение средних и регрессионный анализ) выполнили с использованием пакета программ Statistica 6. При уровнях значимости $p < 0.05$ различия считали статистически существенными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 суммированы результаты цитогенетического трехцветного FISH-исследования культур лимфоцитов периферической крови отобранной группы относительно здоровых доноров-добровольцев. В нее внесены сведения об их поле и возрасте, количестве проанализированных метафаз (всех и только стабильных), частоте обнаруженных аббераций с участием FISH-окрашенных хромосом (приведены только наблюдавшиеся виды перестроек хромосом). Также показан результат пересчета наблюдаемой частоты транслокаций в их частоту в геном-эквивалентном количестве клеток с помощью следующей формулы, выведенной из общего выражения, представленного в рекомендациях МАГАТЭ [1]:

$$F_G = F_p / \{2,05 \times [f_1 \times (1 - f_1) + f_4 \times (1 - f_4) + f_{12} \times (1 - f_{12}) - f_1 f_4 - f_1 f_{12} - f_4 f_{12}]\},$$

где F_G — частота транслокаций на полный геном; F_p — частота зарегистрированных транслокаций при трехцветном FISH-окрашивании; f_1, f_4, f_{12} — процент содержания ДНК в парах хромосом 1, 4

и 12 соответственно по отношению ко всему геному с учетом пола (женщина: 8.15; 6.29 и 4.43%; мужчина: 8.28; 6.39 и 4.50%).

Необходимо отметить, что трехцветный FISH-метод позволяет регистрировать редкие, но интересные перестройки, включающие больше двух хромосом, которые не могли быть выявлены с помощью одноцветного FISH-метода, хотя с формальной точки зрения они и не относятся к категории сложных транслокаций. Такие абберрации хромосом наблюдались нами ранее при построении дозовых зависимостей для транслокаций после γ -облучения крови здоровых доноров *in vitro* в диапазоне от 0.1 до 3.0 Гр (использовались раздельно два разных набора трехцветных ДНК-зондов: к 1, 4 и 12 парам хромосом и к 2, 3 и 8 парам хромосом) [3]. Так, в указанной работе была обнаружена клетка (после облучения крови *in vitro* в дозе 0.35 Гр), в которой наблюдался обмен “по кругу” дистальными участками между тремя хромосомами: 1, 4 и контрокрашенной, когда часть хромосомы 1 присоединилась к хромосоме 4, часть хромосомы 4 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 1. В другой метафазе (после облучения в дозе 2.0 Гр) наблюдался аналогичный обмен дистальными участками между другими тремя хромосомами: 3, 8 и контрокрашенной, т.е. часть хромосомы 3 присоединилась к хромосоме 8, часть хромосомы 8 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 3. Встречались и другие клетки с подобными перестройками. В этих случаях происходит три разрыва в трех хромосомах, что может быть зарегистрировано только при рассматриваемом трехцветном FISH-методе. Возникает вопрос: сколько же транслокаций имеется в этих ситуациях? Действительно, при одной обычной транслокации происходит два разрыва в двух хромосомах, при двух независимых транслокациях — четыре разрыва в четырех хромосомах. Поэтому мы посчитали возможным обозначить обнаруженный феномен парадоксальным числом 1.5 транслокации, хотя в статье Suto Y. et al. [12] предлагалось считать, что данная хромосомная перестройка соответствует двум транслокациям.

В данном цитогенетическом трехцветном FISH-исследовании аналогичный обмен материалом между тремя хромосомами был обнаружен у одного из доноров-добровольцев, когда в результате трех разрывов в трех хромосомах возникали двухцветные структуры

Таблица 2. Результаты цитогенетического трехцветного FISH-анализа (ДНК-пробы к 1, 4 и 12 парам хромосом) культур лимфоцитов периферической крови относительно здоровых доноров-добровольцев
Table 2. The results of the cytogenetic three-color FISH analysis (DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes) of peripheral blood lymphocyte cultures from relatively healthy volunteer donors

№ п/п	Ф.И.О.	Пол	Возраст, лет	Число клеток	Число ста- бильных клеток ¹	Число трансло- каций	Число клеток с трансло- кациями	Частота транслокаций на 100 клеток		Частота аберраций на 100 всех клеток			Частота трансло- каций на 100 всех клеток на геном
								все клетки	стабильные клетки	инсерции	дидентрики	ацентрики	
1	А.Т.А.	ж	47	753	750	1.5	1	0.20	0.20	0	0	0.40	0.58
2	Ж.А.С.	м	21	821	821	0	0	0	0	0	0	0	0
3	К.И.В.	ж	38	941	941	1	1	0.11	0.11	0	0	0.21	0.31
4	М.Б.И.	м	26	272	272	1	1	0.37	0.37	0	0	0	1.07
5	Б.В.А.	м	28	930 ²	929	1	1	0.11	0.11	0	0	0.11	0.31
6	Б.Т.М.	ж	33	1075	1075	2	2	0.19	0.19	0	0	0	0.54
7	З.А.Ю.	м	45	895	895	3	3	0.34	0.34	0	0	0	0.98
8	К.М.Г.	ж	60	877	877	3	3	0.34	0.34	0	0	0	1.00
9	К.С.В.	ж	27	744	743	2	2	0.27	0.27	0	0.13	0	0.79
10	К.Т.В.	ж	34	820	820	2	2	0.24	0.24	0	0	0	0.71
11	К-в С.В.	м	29	936	936	2	2	0.21	0.21	0	0	0	0.62
12	Л.Е.Е.	ж	31	753	753	2	2	0.27	0.27	0	0	0	0.78
13	Н.В.А.	ж	47	1120	1118	2	2	0.18	0.18	0	0.09	0.09	0.52
14	Н.О.В.	ж	34	1069	1069	0	0	0	0	0	0	0	0
15	О.А.С.	м	47	512	512	4	3	0.78	0.78	0	0	0	2.28
16	Р.А.А.	ж	24	883	883	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Б.Н.И.	ж	72	906	903	3	3	0.33	0.22	0	0.22	0.11	0.98
18	Б.Г.П.	ж	68	526	525	1	1	0.19	0.19	0.38	0	0.19	0.56
19	У.Д.Ю.	ж	27	808	807	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 2. Окончание

№ п/п	Ф.И.О.	Пол	Возраст, лет	Число клеток	Число ста- бильных клеток ¹	Число трансло- каций	Число клеток с трансло- кациями	Частота транслокаций на 100 клеток		Частота аберраций на 100 всех клеток			Частота трансло- каций на 100 всех клеток на геном
								все клетки	стабильные клетки	инсерции	дисцентрики	ацентрики	
20	Г.А.А.	м	39	723	722	1	1	0.14	0.14	0	0.14	0	0.40
21	Г.И.А.	ж	38	869	868	4	4	0.46	0.46	0	0	0.12	1.36
22	С.Н.В.	ж	51	1161	1161	2	2	0.17	0.17	0	0	0	0.51
23	С.Ю.Б.	ж	39	933	932	2	2	0.21	0.21	0	0	0.11	0.64
24	Ф.Ю.А.	м	36	697	697	0	0	0	0	0	0	0	0
25	П.Е.В.1	ж	46	1201	1201	1	1	0.08	0.08	0	0	0	0.25
26	Б.В.В.	м	30	1068	1068	2	2	0.19	0.19	0	0	0	0.55
27	Е.В.Ю.	м	29	834	834	0	0	0	0	0	0	0	0
28	Ж.А.М.	м	28	1007	1006	3	3	0.30	0.30	0	0	0.10	0.87
29	И.С.М.	ж	24	649	649	1	1	0.15	0.15	0	0	0	0.46
30	К.А.М.	м	45	929 ²	929	3	3	0.32	0.32	0	0	0	0.94
31	П.Т.В.	ж	38	648	648	2	2	0.31	0.31	0	0	0	0.91
32	П.Е.В.2	ж	53	798	798	4	4	0.50	0.50	0	0	0	1.49
33	О.В.А.	м	41	1018	1016	3	3	0.29	0.30	0	0	0.09	0.86
34	Ш.Е.Г.	м	36	1061	1054	4	4	0.38	0.38	0	0.09	0	1.10
35	Т.Е.Н.	ж	28	874	874	0	0	0	0	0	0	0	0

¹ При определении стабильности клеток учитывали не только аберрации по FISH-окрашенным, но и по контрокрашенным хромосомам.

² Обнаружена дополнительно одна не анализируемая мультиаберрантная клетка.

следующего вида: FISH-окрашенный центромерный участок хромосомы 4 + контрокрашенный бесцентромерный участок, FISH-окрашенный центромерный участок хромосомы 1 + FISH-окрашенный бесцентромерный участок хромосомы 4, контрокрашенный центромерный участок + FISH-окрашенный бесцентромерный участок хромосомы 1.

Как можно видеть из табл. 2, в культурах лимфоцитов периферической крови исследованной группы из 35 относительно здоровых доноров-добровольцев в целом основная доля наблюдаемых FISH-окрашенных перестроек хромосом принадлежит транслокациям. Две инсерции (частота 0,38 на 100 клеток) были обнаружены только у одного донора Б.Г.П. Инверсии и кольца ни у кого не наблюдались. У двух человек было обнаружено по одной мультиабберрантной клетке (МАК), происхождение которых неизвестно. В связи с крайне небольшим количеством нестабильных клеток частота транслокаций во всех клетках практически не отличалась от таковой в стабильных клетках. При проверке по непараметрическому критерию Вилкоксона средняя групповая частота транслокаций (0.218 ± 0.029) была статистически существенно в 3.3 раза выше ($p = 0.00016$), чем аналогичная частота всех FISH-окрашенных нестабильных aberrаций — дицентрики и ацентрики — (0.066 ± 0.019).

ОБСУЖДЕНИЕ

При дальнейших сравнениях отдельных групп доноров по обнаруженным частотам транслокаций использовался непараметрический *U*-критерий Манна—Уитни. С его помощью, в частности, было показано отсутствие возрастных различий между женщинами и мужчинами: средние составили соответственно 40.4 ± 3.1 и 35.0 ± 2.2 лет при $p = 0.409$. Наблюдаемые средние частоты FISH-транслокаций на 100 всех клеток у женщин и мужчин были примерно одинаковы: 0.20 ± 0.03 и 0.24 ± 0.06 соответственно ($p = 0.522$), что свидетельствует об отсутствии гендерных различий.

Зарегистрированные средние частоты транслокаций у никогда не куривших (24 донора), куривших ранее за 2.5–10 лет до исследования (семь доноров) и у курящих сейчас (четыре донора) равнялись соответственно 0.22 ± 0.03 ; 0.21 ± 0.10 и 0.24 ± 0.03 и существенно не отличались друг от друга: $p = 0.257$ – 0.844 . При этом у когда-либо куривших количество выкуриваемых пачек в день варьировало от половины пачки в неделю до 1.5 пачек в день. Вполне вероятно, что отсутствие

эффекта курения на уровне перестроек хромосом может быть обусловлено тем, что в исследованной группе как общее число курящих или куривших ранее было значительно меньше, чем не куривших никогда, да и злостные курильщики практически отсутствовали. В то же время, судя по данным литературы, повышение частот транслокаций в связи с курением наблюдалось только у злостных курильщиков (см. обзор [2]).

Также отсутствовали статистически существенные различия по средним уровням транслокаций у лиц, переболевших и не болевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 (0.21 ± 0.07 и 0.22 ± 0.03 при $p = 0.331$).

В настоящее время достаточно сложно найти взрослых людей, которые никогда не подвергались бы тому или иному диагностическому рентгенологическому обследованию. Поэтому в нашей группе доноров-добровольцев только семь индивидуумов не подвергались таким медицинским процедурам. У шести человек имелись только стоматологические рентгенологические исследования. Соответственно средние частоты FISH-транслокаций составили у них 0.19 ± 0.07 и 0.20 ± 0.05 при $p = 0.721$, демонстрируя отсутствие влияния стоматологического рентгенологического исследования на уровень этих перестроек хромосом в лимфоцитах периферической крови. Это позволяет абстрагироваться от данного вида диагностики и рассмотреть в качестве ведущих другие виды медицинского диагностического радиационного воздействия, а именно, флюорографию при ежегодной диспансеризации и местное диагностическое рентгеновское облучение (маммография, разовая флюорография, компьютерная томографии почки или головы, обследование носа, грудной клетки или легких). Не считая трех доноров, которые были подвергнуты как ежегодной флюорографии, так разовым рентгенологическим исследованиям, в эти две выделенные подгруппы вошли девять и десять человек со средней частотой транслокаций 0.26 ± 0.07 и 0.23 ± 0.05 соответственно, которые статистически значимо не различались между собой ($p = 0.879$). В итоге в подгруппу с отсутствием диагностического облучения (не считая зубов) вошли 13 человек, тогда как подгруппа с местным диагностическим радиационным воздействием включала 22 человека. Средние частоты транслокаций соответственно составили 0.19 ± 0.04 и 0.23 ± 0.04 при $p = 0.864$, демонстрируя отсутствие заметного влияния медицинского диагностического локального облучения на уровень указанных хромосомных перестроек.

Относительно обнаруженных мультиаберрантных клеток (МАК) (по одной у двух человек) можно сказать следующее. Этот феномен до сих пор не имеет однозначного объяснения. К ним при классической окраске хромосом обычно относят метафазы с 3–5 и более абберациями хромосом, включающими в основном обмены хромосомного типа (дицентрики, полицентрики, центрические и ацентрические кольца), причем отсутствует явная связь с уровнем мутагенного воздействия [10, 11]. Они, например, были обнаружены в различных группах людей, подвергавшихся действию ионизирующей радиации, причем наибольшее количество их “носителей” было зарегистрировано у работников радиохимического производства, имевших контакт с солями плутония [12]. Одно из последних известных нам сообщений касается двух радиологов из Кореи, у которых наряду с повышенными уровнями дицентриков и FISH-транслокаций было обнаружено по одной МАК [13]. Однако в статье, посвященной этому вопросу, приводятся и другие группы людей, у которых встречались МАК: это не только японская когорта выживших после атомных бомбардировок или Чернобыльская популяция, но и водолазы, индейцы Южной Америки (они, собственно говоря, и инициировали обсуждение данной проблемы) и некоторые другие контрольные группы (см. [10]). Также высказывалась гипотеза о возможной вирусной этиологии МАК. В таком случае перестройки хромосом в МАК будут относиться не к хромосомному, как при действии радиации, а к хроматидному типу [14]. В нашей контрольной группе один из доноров (Б.В.А.) с МАК раньше курил, проходил ежегодную флюорографию и подвергся стоматологическому рентгенологическому обследованию в течение последних шести месяцев, у другого же была только стоматологическая рентгенография свыше 1 года назад. Поэтому вопрос об источнике обсуждаемого феномена остается открытым. Отметим, что МАК встречались в контрольных группах (при классической окраске хромосом) и в некоторых других исследованиях [15, 16].

С помощью регрессионного анализа было изучено влияние возраста на частоту FISH-регистрируемых транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови в данной группе относительно здоровых доноров добровольцев. Используя метод наименьших квадратов, были получены следующие уравнение для реальной и геномной частот транслокаций:

$$Y_A = (0,0096 \pm 0,0890) + (0,0054 \pm 0,0022) \times A,$$

где Y_A — реальная частота транслокаций на 100 всех клеток, A — возраст (годы) при $r = 0.393$ и $p = 0.020$;

$$Y_A = (0,0249 \pm 0,2611) + (0,0161 \pm 0,0065) \times A,$$

где Y_A — геномная частота транслокаций на 100 всех клеток, A — возраст (годы) при $r = 0.386$ и $p = 0.019$.

График возрастной зависимости реальных частот транслокаций представлен на рис. 1.

Таким образом, в соответствии со шкалой Чертока (см. [17]) наблюдается корреляционная связь умеренной силы между фоновым уровнем FISH-транслокаций и возрастом доноров в диапазоне от 21 до 72 лет.

Представление о том, как наши данные соотносятся со сведениями, приведенными в упомянутой выше мета-аналитической статье, основанной на работах разных лабораторий из различных стран [18], дает рис. 2. Он демонстрирует полученную в этом международном исследовании связь с возрастом уровней транслокаций в геном-эквивалентных клетках, на которую наложены результаты настоящего исследования. Последние в зависимости от возраста доноров были разбиты на три группы:

- 1) 21–29 лет, средний возраст 26.8 ± 0.7 лет, 12 человек, средняя частота транслокаций на 100 геном-эквивалентных клеток — 0.40 ± 0.12 ;
- 2) 31–40 лет, средний возраст 36.0 ± 0.9 лет, 11 человек, средняя частота транслокаций на 100 геном-эквивалентных клеток — 0.61 ± 0.13 ;
- 3) 41–72 года, средний возраст 51.8 ± 2.8 лет, 12 человек, средняя частота транслокаций на 100 геном-эквивалентных клеток — 0.92 ± 0.16 .

Все данные показаны в виде средних с 95%-ными доверительными интервалами или за 5 лет (статья [18]), или за обозначенные выше интервалы времени (результаты настоящей работы). Как можно видеть, на рис. 2 наблюдается хорошее соответствие между этими двумя группами сведений. Таким образом, обнаруженные частоты FISH-транслокаций в обследованной группе доноров из России (35 человек) очень близки к таковым из международного исследования (1455 человек в том же общем возрастном диапазоне). Понятно, что более широкие доверительные

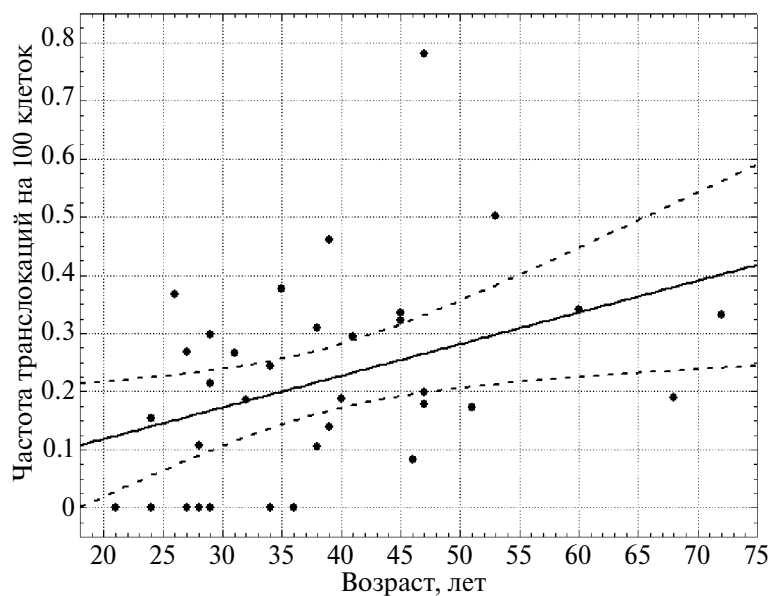


Рис. 1. График зависимости (сплошная линия) с 95%-ными доверительными интервалами (пунктирные линии) реальных частот FISH-регистрируемых транслокаций от возраста относительно здоровых доноров.

Fig. 1. Dependence graph (solid line) with 95% confidence intervals (dashed lines) of the real frequencies of FISH-detected translocations on the age of relatively healthy donors.

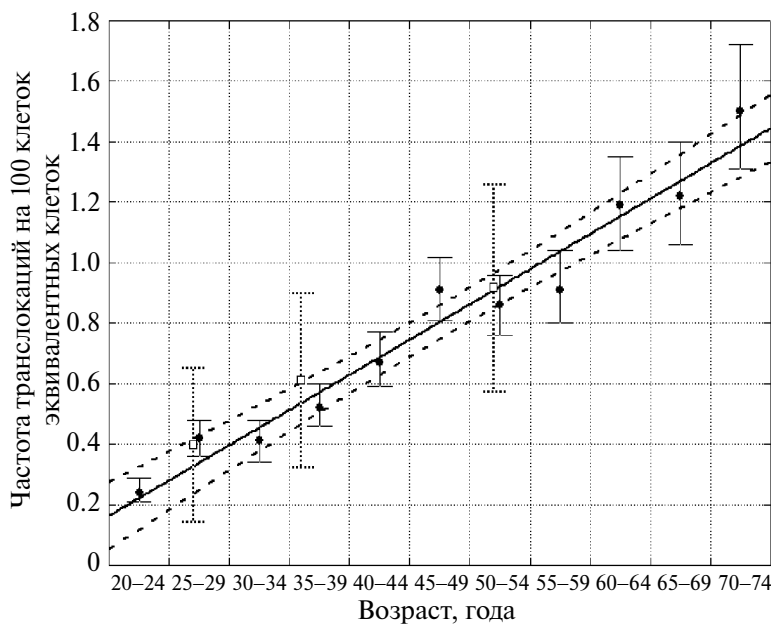


Рис. 2. Зависимости частот транслокаций на 100 геном-эквивалентных клеток от возраста. Сплошными линиями и заштрихованными кружками выделены данные, взятые из статьи [18]: средние с 95%-ными доверительными интервалами за 5 лет и построенная для них линейная регрессия (95%-ная доверительная зона регрессии обозначена пунктиром). Точечными линиями и квадратами обозначены средние с 95%-ными доверительными интервалами, полученные в настоящей работе (см. текст).

Fig. 2. Dependences of translocation frequencies per 100 genome-equivalent cells on age. The data taken from the article [18] are highlighted by shaded circles and solid lines: averages with 95% confidence intervals for 5 years and a linear regression constructed for them (the 95% confidence zone of the regression is indicated by a dotted line). Squares and pointed lines indicate averages with 95% confidence intervals obtained in this work (see text).

интервалы для групповых значений в нашей работе обусловлены меньшим числом включенных в разработку людей по сравнению с упомянутой мета-аналитической статьёй [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В контрольной группе доноров-добровольцев из 35 человек при использовании трехцветного FISH-метода основную массу регистрируемых окрашенных перестроек составляли транслокации, частота которых существенно в 3.3 раза превышала уровень нестабильных аберраций (дигцентрики и ацентрики).

2. Наблюдалась корреляционная зависимость умеренной силы фонового уровня FISH-транслокаций от возраста доноров в диапазоне от 21 до 72 лет.

3. Обнаруженные в данной работе уровни транслокаций в геном-эквивалентных клетках в их связи с возрастом достаточно хорошо согласовывались с результатами международных исследований.

4. Пол доноров не сказывался на частоте транслокаций.

5. Не было обнаружено существенного влияния различных видов медицинского диагностического облучения, курения и заболевания новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на исследуемый индекс повреждения хромосом.

Работа выполнена без целевого финансирования.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
2. Ломоносова Е.Е., Нугис В.Ю., Никитина В.А., Козлова М.Г. Контрольные уровни FISH-регистрируемых транслокаций: Обзор литературы. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2022;62(4):399-407. [Lomonosova E.E., Nugis V.Yu., Nikitina V.A., Kozlova M.G. Control levels of FISH-registered translocations: Literature review. *Radiation Biology. Radioecology*. 2022;62(4):399-407. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0869803122040075>.
3. Нугис В.Ю., Снигирева Г.П., Ломоносова Е.Е. и др. Трехцветный FISH-метод: кривые доза—эффект для транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови после гамма-облучения in vitro. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2020;65(5):12-20. [Nugis V.Yu., Snigiryova G.P., Lomonosova E.E. et al. Three-color FISH method: dose-effect curves for translocations in peripheral blood lymphocyte cultures after gamma-irradiation in vitro. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(5):12-20. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20>.
4. Севаньяев А.В., Хвостунов И.К., Снигирева Г.П. и др. Сравнительный анализ результатов цитогенетических обследований контрольных групп лиц в различных отечественных лабораториях. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013;53(1):5-24. [Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Snigireva G.P. et al. The comparative analysis of cytogenetic examination of control groups carried out by different Russian laboratories. *Radiation Biology. Radioecology*. 2013;53(1):5-24. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803112069124>.
5. Неронова Е.Г., Алексанин С.С. Оценка цитогенетических показателей у лиц, контактировавших с ионизирующими излучениями. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. 2014;(1):70-76. [Neronova E.G., Alexanin S.S. Assessment of cytogenetic indices in persons exposed to ionizing radiation. *Medical-Biological and Socio-Psychological Problems of Emergency Situations*. 2014;(1):70-76].
6. Sorokine-Durm I., Whitehouse C., Edwards A. The variability of translocation yields amongst control populations. *Radiat. Prote. Dosim.* 2000;88(1):93-99. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a033026>.
7. Нугис В.Ю., Галстян И.А., Суворова Л.А. и др. Случай острого лейкоза у облученного во время аварии пациента с выявленными цитогенетическими клонами в костном мозге. *Гематология и трансфузиология*. 2017;62(2):90-95. [Nugis V.Yu., Galstian I.A., Suvorova L.A. et al. The case of acute leukemia in an emergency irradiated patient with an identified cytogenetic clones in the bone marrow. *Hematology and Transfusiology*. 2017;62(2):90-95. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0234-5730/2017-62-2-90-95.
8. Ломоносова Е.Е., Нугис В.Ю., Снигирева Г.П. и др. Цитогенетический анализ культур лимфоцитов периферической крови пациента в отдаленные сроки после аварийного облучения с помощью трехцветного FISH-метода. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2022;62(1):5-17. [Lomonosova E.E., Nugis V.Yu., Snigiryova G.P. et al. Analysis peripheral blood lymphocytes cultures of patient in long terms after emergency irradiation with the help of three-color FISH method. *Radiation*

- Biology. Radioecology.* 2022;62(1):5-17. (In Russ.)). <https://doi.org/10.31857/S0869803122010064>.
9. Sorokine-Durm I., Durand V., Delbos M. et al. A French view on FISH painting as a biodosemeter. *Radiat. Prot. Dosim.* 2000;88(1):35-44. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a033017>.
 10. Bochkov N.P., Katosova L.D. Analysis of multiaberrant cells in lymphocytes of persons living in different ecological regions. *Mutat. Res.* 1994;323(1-2):7-10. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(94)90038-8).
 11. Попова П.А., Назаренко Л.П., Назаренко С.А. Мультиабберрантные клетки при внутреннем облучении источниками плотно-ионизирующего облучения. *Генетика.* 2004;40(12):1709-1713. [Popova N.A., Nazarenko L.P., Nazarenko S.A. Multiaberrant cell formation caused by exposure to internal densely-ionizing irradiation. *Russian Journal of Genetics.* 2004;40(12):1709-1713. (In Russ.)].
 12. Aseeva E.A., Snigiryova G.P., Neverova A.L. et al. Multiaberrant cells in groups of people exposed to radiation in different situations and their possible biological role. *Biophysics.* 2010;55(3):496-503. <https://doi.org/10.1134/S0006350910030243>.
 13. Jang S., Lee Y., Songwon S. et al. Rogue cell-like chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of interventional radiologists: A case study. *Mutat. Res. Gen. Tox. En.* 2020;856-857:503234. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503234>.
 14. Gileva E.A., Poliavina O.V., Apekina N.S. et al. Viral infections and chromosome aberrations in Bank Vole from natural and laboratory populations. *Russian Journal of Genetics.* 2001;37(4):401-406. <https://doi.org/10.1023/A:1016602426120>.
 15. Исубакова Д.С., Халюзова М.В. Литвяков Н.В. и др. Цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови у работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся профессиональному облучению. *Радиация. биология. Радиоэкология.* 2021;61(4):353-366. [Khalyuzova M.V., Litviakov N.V., Isubakova D.S. et al. Cytogenetic anomalies in blood lymphocytes in employees of Siberian group of chemical enterprises exposed to occupational irradiation. *Radiation Biology. Radioecology.* 2021;61(4):353-366. (In Russ.)].
 16. Тимошевский В.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А. и др. Хромосомный и цитомный анализ соматических клеток работников радиохимического производства с инкорпорированным ^{239}Pu . *Радиация. биология. Радиоэкология.* 2010;50(6):672-680. [Timoshevskiy V.A., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. et al. Chromosome and cytochrome assay of the somatic cells of nuclear chemical production workers with incorporated ^{239}Pu . *Radiation Biology. Radioecology.* 2010;50(6):672-680. (In Russ.)].
 17. Гостенина В.И., Карандин К.С. Особенности применения корреляционного анализа в социологических исследованиях. *Экономика. Социология. Право.* 2017;8(4):73-81. [Gostenina V.I., Karandin K.S. Peculiarities of the use of correlation analysis in sociological research. *Economics. Sociology. Law.* 2017;8(4):73-81. (In Russ.)]. <http://www.profit-brgu.ru>.
 18. Sigurdson A.J., Ha M., Hauptmann M., Bhattia P. et al. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat. Res.* 2008; 652(2):112-121. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.01.005>

Control Levels of Translocations in Human Peripheral Blood Lymphocyte Cultures Determined using Three-Color FISH-Staining

E. E. Lomonosova, V. Yu. Nugis*, M. G. Kozlova, V. A. Nikitina

State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center
of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

*E-mail: nugisvju@list.ru

This paper presents the results of using three-color FISH-staining of chromosomes (DNA probes for chromosome pairs 1, 4, and 12) to study the control level of translocations in peripheral blood lymphocyte cultures of 35 relatively healthy volunteer donors aged from 21 to 72 years. Such information is necessary for the retrospective establishment of both the fact of overexposure itself and for an adequate assessment of the dose received. Translocations made up the bulk of the recorded colored rearrangements. Their frequency was significantly 3.3 times higher than the level of unstable aberrations (dicentrics and acentrics). At the same time, a moderate correlation was observed between the level of FISH translocations and the age of the donors, and gender did not affect this indicator in any way. Also, no significant effect of various types of medical diagnostic radiation, smoking and the disease of the new coronavirus infection COVID-19 on the studied index of chromosome damage was found. In general, the detected frequencies of translocations in genome-equivalent cells in their relationship with age were in fairly good agreement with the results of international studies.

Keywords: peripheral blood lymphocyte culture, control group, three-color FISH method, translocations, retrospective dose assessment

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ломоносова Елена Евгеньевна (Lomonosova Elena Evgenievna), <https://orcid.org/0000-0003-3739-4261>, Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия (State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia); e-mail: mrs.lomonosova@gmail.com.

Нугис Владимир Юрьевич (Nugis Vladimir Yurievich), <https://orcid.org/0000-0001-7396-0246>, Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия (State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia); e-mail: nugisvju@list.ru.

Козлова Мария Германовна (Kozlova Maria Germanovna), <https://orcid.org/0000-0001-8159-0513>, Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия (State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia); e-mail: koslovaamg@yandex.ru.

Никитина Виктория Андреевна (Nikitina Victoria Andreevna), <https://orcid.org/0000-0002-3150-7686>, Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия (State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal medical Biological Agency, Moscow, Russia); e-mail: nikitinava@yandex.ru.

Вклад авторов: все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.