

## **ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОМОСОМ В РАДИОЛОГИИ**

Пикалова Л.В.

*Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина,  
Санкт-Петербург, Россия*

*196605, г. Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, д.10    Тел.: +7(812)466-65-58*

История исследования хромосом насчитывает свыше ста лет – с тех пор, как В. Флеминг в 1879 г. впервые наблюдал продольное расщепление хромосом при делении клетки аксолотля. В последующие годы хромосомы были обнаружены и описаны у множества объектов, как животного, так и растительного происхождения. Достигнутые успехи определялись в первую очередь совершенствованием оборудования и методик приготовления хромосомных препаратов. Первостепенное значение имело развитие техники микроскопии и усовершенствование самих микроскопов.

Последние достижения в геномном анализе неразрывно связаны с использованием и развитием методов молекулярной биологии: различных вариантов амплификации ДНК (RFLP, PCR и др.) и цитологических подходов (дифференциальное окрашивание хромосом и гибридизация *in situ* и др.). Ни один из вышеперечисленных методов не является всеобъемлющим и безошибочным. Эффективность методов определяется степенью, в которой они решают поставленные задачи, в частности характеризуют прямо или опосредованно сходство ДНК между видами. Несмотря на все эти достижения, анализ хромосом остается важной, а в отношении некоторых объектов основной частью геномного анализа.

Проблема изучения индивидуальных биологических реакций организма при радиационных воздействиях, поиск наиболее характерных для этих воздействий биологических изменений занимает одно из ключевых мест в современной радиобиологии. Так, еще в середине прошлого столетия возникло особое направление в радиобиологии – биодозиметрия.

Существует пять групп ретроспективного выявления последствий дозовых нагрузок на организм при внешнем и внутреннем облучении: цитогенетические, гематологические, иммунобактериологические, биохимические и биофизические. При оценке эффектов биологического действия радиации в малых дозах возможна регистрация цитогенетических и гематологических повреждений: частоты хромосомных перестроек, числа лимфоцитов с микроядрами, а также частоты клеток-носителей соматических мутаций в периферической крови (Кудряшов Ю.Б., 2004).

Мутагенный эффект, индуцированный ионизирующим излучением, может лежать в основе возникновения таких патологических состояний, как наследственные и онкологические заболевания, ускорение процессов старения и

др. Биоиндикатором мутагенного воздействия радиации являются первичные повреждения генома – хромосомные и генные мутации в различных клетках-мишенях. Так как хроматидные aberrации могут образовываться под действием факторов различной природы (инкорпорированные радионуклиды, химические вещества, инфекция), они являются менее специфичными показателями действия радиации. Поэтому хроматидные aberrации не следует использовать при биологической оценке дозы (Пяткин Е.К. с соавт., 1989). Наиболее распространенными, апробированными и корректными из генетических маркеров облучения остаются специфические для действия радиации цитогенетические нарушения – стабильные и нестабильные aberrации хромосомного типа, оценка частоты которых используется также для ориентировочной дозиметрии радиационного воздействия (Севанькаев А.В., Деденков А.Н., 1990).

Метод хромосомных aberrаций принят МАГАТЭ в 1986 г. в качестве официального метода биологической дозиметрии. Основой радиационной биодозиметрии по aberrациям хромосом является количественная зависимость образования aberrаций в лимфоцитах периферической крови и костном мозге от дозы излучений. Поскольку лимфоциты периферической крови обладают высокой радиочувствительностью, их содержание в крови у организма, облученного в высоких дозах, вскоре резко снижается, и их количество может оказаться слишком малым для культивирования. В то же время в отделах костного мозга, особенно при неравномерном облучении, уровень лимфоцитов может оставаться достаточным для подсчета aberrаций хромосом, и таким образом трудности в выборе клеток могут быть преодолены (Кудряшов Ю.Б., 2004).

Из всех видов aberrаций хромосом для целей диагностики радиационных поражений чаще всего используется подсчет дицентриков, ацентрических фрагментов и центрических колец. Биологическая дозиметрия по aberrациям хромосом в культуре лимфоцитов дает достоверную информацию в случаях относительно равномерного облучения (В.Е. Комар, 1992; Пяткин Е.К. с соавт., 1989). При неравномерном воздействии с перепадом дозы более чем в 2 – 3 раза информативность показателя снижается. Вместе с тем неравномерность облучения может быть оценена по характеру распределения дицентриков по клеткам и при сопоставлении данных, полученных с помощью разных цитогенетических показателей (В.Е. Комар, 1992). Поглощенную дозу определяют с наибольшей статистической достоверностью по числу дицентриков и других полицентриков или по суммарному числу всех aberrаций и проценту aberrатных клеток. При неравномерном радиационном воздействии (перепад доз более чем в 2 – 3 раза) средняя частота, например дицентриков, отражает дозу, усредненную по всему телу, и является малоинформативной.

Для выявления неравномерности можно использовать непосредственно культуры лимфоцитов периферической крови. При этом признаками равномерности облучения будут служить соответствие распределения дицентриков по клеткам теоретическому распределению Пуассона и отсутствие существенных различий между дозами, вычисленными по разным цитогенетическим показателям: средней частоте дицентриков (на 100 проанализированных клеток), проценту клеток с дицентриками и частоте дицентриков (на 1 клетку с дицентриками) (Пяткин Е.К. с соавт., 1989).

Количественная ретроспективная дозовая оценка по хромосомным aberrациям у хронически облученных людей и в отдаленные сроки после воздействия излучений встречает трудности. Так, даже при раннем цитогенетическом анализе, исключающем элиминацию aberrаций хромосом вследствие гибели клеток, на дозовой кривой в диапазоне малых доз от 0,1 – 0,2 Гр до 0,5 Гр разброс индивидуальных значений настолько велик, что установление дозы облучения становится сложной проблемой. Вместе с тем имеются данные о длительном сохранении хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у профессионалов, работающих с источниками ионизирующего излучения. Однако ретроспективную оценку индивидуальных доз провести не удастся (Кудряшов Ю.Б., 2004).

Метафазный метод впервые стал использоваться в радиационной генетике и зарекомендовал себя как непревзойденный количественный и качественный анализ нарушений, сыгравший большую роль в разработке теорий радиационной генетики.

Метафазный метод выявляет как нестабильные хромосомные aberrации - дицентрики, кольца, фрагменты, так и стабильные aberrации (транслокации) (Севанькаев А.В., Деденков А.Н., 1990). Наиболее разработанным и широко используемым методом биологической дозиметрии является анализ частоты нестабильных aberrаций хромосом (дицентриков и центрических колец) в лимфоцитах периферической крови облученного организма. По данным Севанькаева с соавт. (1994) успешная оценка индивидуальной дозы этим методом возможна лишь непосредственно после облучения, причем, как правило, однократного острого облучения или же в сравнительно короткие сроки после него (обычно не более чем через 3 – 4 мес.). Это связано с тем, что aberrатные клетки с течением времени постепенно элиминируются из циркулирующей крови. Однако Неронова Е.Г. с соавт. (2008), Снегирева Г.П. с соавт. (2008) показали, что у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС на протяжении более 20 лет средняя частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови достоверно превышала контрольный уровень. При этом частота дицентриков и центрических колец – маркеров радиационного воздействия была выше аналогичного показателя в

контрольной группе в 3,5 – 7 раз в зависимости от сроков работы и длительности нахождения в зоне аварии.

Метафазный метод требует культивирования клеток в условиях *in vitro*. Это осложняет его применение в экстремальных условиях аварийных ситуаций и в случаях, когда необходимы скрининговые исследования в больших количествах (Севаньяев А.В., Деденков А.Н., 1990).

Для обнаружения клеток с хромосомными aberrациями требуются специально обученные и опытные лаборанты, что делает процедуру дорогостоящей и занимающей много времени. Тест с микроядрами требует небольшой подготовки персонала, а определение может быть автоматизировано.

Перспективной является оценка выхода микроядер в облученных популяциях клеток и их потомков. Использование микроядерного теста при исследовании воздействия на организм мутагенных и канцерогенных препаратов обуславливается простотой и стабильностью результатов, полученных этим методом, по сравнению с методом хромосомного анализа. Однако обилие работ с использованием микроядерного анализа не внесло ясности в механизм их формирования (С.Н. Колюбаева с соавт., 1995).

Микроядра могут быть результатом потери центромерного участка хромосомы, нарушения веретена деления, патологического митоза или результатом первой стадии дробления ядра (кариорексис) при апоптической гибели клеток. В пользу каждого из этих механизмов имеются веские экспериментальные доказательства (Колюбаева с соавт., 1993).

По данным И.И. Пелевиной и соавт. (2001) микроядра возникают в процессе деления хромосомного материала лимфоцитов между двумя дочерними клетками из-за препятствия, создаваемого aberrациями при переходе разорванных и слипшихся хромосом в одно или два дочерних ядра и оказываются в отдельных микроядерных структурах, наблюдаемых в клетках, не сумевших разделиться из-за повреждения веретена или центромеры.

Подсчет микроядер в лимфоцитах крови был предложен как более простой и быстрый способ получения оценки доз. В настоящее время накоплено значительное число данных о зависимости доза – эффект *in vitro* для микроядер при действии редкоионизирующего излучения. Частота микроядер, индуцируемых плотноионизирующими излучениями, изучена меньше. В исследованиях была выявлена значимая межиндивидуальная вариабельность как по спонтанной частоте микроядер, так и по радиочувствительности самих индивидуумов. При этом спонтанная частота микроядер и радиочувствительность индивидуумов между собой не коррелируют. В исследованиях с иммунофлуоресцентным окрашиванием было показано, что значительная часть микроядер формируется из ацентрических фрагментов, и

для объяснения наблюдаемых различий в частотах в области высоких доз было высказано предположение о возможности формирования микроядер, включающих в себя более одного ацентрического фрагмента. Это предположение частично подтверждено в работах, где показано, что размер микроядер увеличивается с ростом дозы.

Существенная межиндивидуальная вариабельность как спонтанной частоты, так и радиочувствительности индивидуумов, неопределенность дозовой зависимости делает указанное выше преимущество микроядерного теста сомнительным для целей биодозиметрии, т.е. микроядерный тест содержит все те же недостатки, присущие традиционному цитогенетическому методу (Севанькаев с соавт., 1994).

Зависимость числа микроядер от дозы облучения описывается линейно-квадратичной функцией. Достоверное отличие уровня микроядер от контрольного выявляется, начиная с дозы 0,25 Гр.

Если сравнивать дозовые кривые зависимости числа хромосомных aberrаций и микроядер при одном и том же радиационном воздействии, то становится очевидным их сходство. Однако, корреляционный анализ этих показателей у одних и тех же лиц выявляет коэффициент корреляции, не превышающей 0,55, что в свою очередь свидетельствует о различной природе возникновения микроядер и хромосомных aberrаций (Колюбаева С.Н. с соавт., 1993).

При использовании микроядерного теста определяется неточность в определении дозы при величинах больших или равных 2 Гр, что связано главным образом с индивидуальными различиями в выходе индуцированных облучением микроядер. Малые дозы (0,3 Гр и меньше) не могут быть достоверно определены данным методом из-за индивидуальных различий в частоте спонтанных микроядер (Thierens H., 1991).

По данным С.Н. Колюбаевой (2008) микроядерный тест целесообразно использовать в случаях определения облученности больших групп людей в дозе до 1 Гр. Использование в качестве показателя клеток с 3 и более микроядрами может быть дополнительным свидетельством факта облученности, так как такие формы не встречаются у здоровых лиц.

А.В. Севанькаев с соавт. (1994) предлагают использовать микроядерный тест в радиационных исследованиях только для выявления групп повышенного риска, а не для оценки дозы облучения. Это связано с тем, что образование микроядер происходит в результате различных мутагенов (ионизирующее, ультрафиолетовое излучения, химические соединения и т.д.). Для последующей оценки доз облучения необходимо использование более специфических методов дозиметрии.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) – один из наиболее точных методов для обнаружения облученности организма (Колюбаева С.Н., 2008). Метод основан на селективном окрашивании пар хромосом с помощью специфичных к определенным последовательностям ДНК молекулярных зондов и позволяет сравнительно быстро проанализировать значительное число (несколько сотен) клеток на наличие стабильных хромосомных aberrаций. При этом с помощью прокрашивания центромер методика позволяет различать симметричные обмены от дицентриков (Севаньяев А.В. с соавт., 1994; Ллойд Д.К., Эдвардс А.А., 1993). 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 (Севаньяев А.В. с соавт., 1994; Комар В.Е., 1992).

Как правило, для определения факта облученности используют библиотеку генов нескольких хромосом с последующим пересчетом выявленных повреждений на весь геном. Однако такой пересчет не всегда бывает адекватным, так как хромосомы имеют разную радиочувствительность за счет многих причин, в том числе: длина теломер, состав генов, наличие общих и ломких сайтов и т.д. Все эти проблемы можно решить при использовании мультиколорного FISH (Колюбаева С.Н., 2008).

Метод FISH считают перспективным методом биологической дозиметрии для оценки величины дозы в отдаленные сроки после острого или пролонгированного облучения даже при низких уровнях радиационного воздействия (Репин М.В. с соавт., 1996; Ллойд Д.К., Эдвардс А.А., 1993). У обезьян *Macaca mulatta* подтверждено сохранение отчетливой зависимости частоты индуцируемых транслокаций от дозы облучения по прошествии 28 лет после того, как оно произошло; также эти данные подтверждают эффективную персистенцию реципрокных транслокаций в кариотипе, что может быть использовано в качестве «исторического маркера» имевших ранее облучений. Более того, сопоставление данных, полученных *in vitro* и *in vivo*, указывает на сохранение частоты транслокаций, индуцированных в 1965 г (Lucas J.N., 1996).

FISH-метод позволяет достаточно эффективно анализировать стабильные хромосомные aberrации при низких дозах облучения (Репин М.В. с соавт., 1996). Использование этого метода для биодозиметрии в области высоких доз (более 1,5 Гр) может быть затруднено из-за того, что в части стволовых клеток будут индуцироваться как стабильные, так и нестабильные хромосомные aberrации. Клетки, содержащие оба типа этих aberrаций, репродуктивно гибнут из-за наличия в них нестабильных aberrаций. При этом из анализа исчезает часть стабильных aberrаций, содержащихся в этих же клетках, что приведет к относительному снижению их частоты в лимфоцитах

периферической крови, в результате чего и ретроспективная оценка дозы будет менее надежна.

Однако пока не ясна вероятность участия различных хромосом в образовании стабильных aberrаций. Пока нельзя полностью исключить возможность формирования клоновых aberrаций у облученных организмов и возможности более частого или, наоборот, более редкого участия определенных хромосом в формировании стабильных хромосомных aberrаций. Из этого следует, что при использовании метода FISH при пересчете наблюдаемой частоты стабильных aberrаций на весь кариотип возможно завышение либо, наоборот, занижение частоты этих aberrаций по сравнению с реальной частотой. Соответственно это приведет к завышению или занижению оценки дозы.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* широко применяется в последнее время в цитогенетических исследованиях. Он обладает хорошей разрешающей способностью, поскольку различия хромосом позволяют регистрировать мелкие перестройки, не идентифицируемые другими методами; меньшей трудоемкостью, т.к. верификация хромосомных аномалий достаточно проста и не требует высокой квалификации исследователя. Однако метод достаточно сложен и трудоемок и требует хорошего оборудования и реактивов (Севанькаев А.В. с соавт., 1994).

Методы дифференциального окрашивания позволяют идентифицировать на препарате как отдельную хромосому, так и любой участок хромосомы, выявляя так называемые бэнды. На метафазных хромосомах малой степени спирализации идентифицируются около 750 бэндов, на прометафазных хромосомах 2500 - 3000. На сегодняшний день разработаны методы многоцветной окраски - *multicolor banding* (до 25 цветов) интерфазных и метафазных хромосом (Рахманалиев Э.Р. с соавт., 2004).

Однако даже самые высокоразрешающие методы дифференциальной окраски не могут выявить дополнительные участки, присоединенные к хромосоме, отсутствие какого-либо участка или неправильное расположение, если длина участка меньше 3 – 5 % длины хромосомы (Колюбаева С.Н., 2008).

Разработанные методы учета нестабильных и стабильных aberrаций хромосом (частота aberrантных клеток и различных типов хромосомных aberrаций, сочетание определенных aberrаций в aberrантной клетке, характер распределения aberrаций по клеткам, соотношение числа парных фрагментов и обменных aberrаций, количество aberrаций на aberrантную клетку) дают возможность реконструировать поглощенные дозы ионизирующих излучений в разные сроки после воздействия: от нескольких дней до нескольких

десятилетий. Цитогенетические методы биологической дозиметрии применимы для обследования ликвидаторов последствий аварийных ситуаций на радиационно-опасных объектах; населения, проживающего на территориях, загрязненных радионуклидами; для оценки экологической обстановки; для изучения радиационных воздействий на лабораторных животных и т.д. На основе результатов могут прогнозироваться канцерогенные и генетические последствия облучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коллюбаева С.Н., Ракецкая В.В., Борисова Е.А., Комар В.Е. Исследование радиационных повреждений в лимфоцитах человека методом микроядерного и хромосомного анализа// Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т.35, вып. 2. – С. 150 – 156.
2. Коллюбаева С.Н. Использование цитогенетических методов в радиационной медицине// Вестник Российской Военно-медицинской Академии. Приложение 1. – 2008, № 3 (23). – С. 179.
3. Комар В.Е. Современное состояние проблемы биологической индикации лучевых поражений// Радиобиология. – 1992. – Т.32, вып. 1. – С. 84 – 96.
4. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). – М.: Физматлит – 2004. – С. 323 – 325.
5. Ллойд Д.К., Эдвардс А.А. Хромосомные повреждения в лимфоцитах человека, вызванные низкими дозами облучения//Гематология и трансфузиология. – 1993. – Т.38, № 1. – С. 3 – 7.
6. Неронова Е.Г., Слозина Н.М., Макарова Н.В. Цитогенетические нарушения и заболеваемость у ликвидаторов последствий аварий на Чернобыльской АЭС// Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2008. – Т.54, № 2. – С. 5 – 9.
7. Пелевина И.И., Алексеенко А.В. и др. Уровень спонтанных и индуцированных облучением цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови детей в зависимости от возраста и условий жизни.// Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001, Т.41, № 5. – С. 489 – 499.
8. Пяткин Е.К., Нугис В.Ю., Чирков А.А. Оценка поглощенной дозы по результатам цитогенетических исследований культур лимфоцитов у пострадавших при аварии на Чернобыльской АЭС// Медицинская радиология. – 1989, Т.34, № 6. – С. 52 – 56.
9. Рахманалиев Э.Р., Климов Е.А., Сулимова Г.Е. Методы картирования геномов млекопитающих. Картирование с использованием радиационных гибридов (РН-картирование)// электронный журнал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН <http://lab-cga.ru>, – 2004.

10. Репин М.В., Говорун Р.Д., Лукашова Е., Красавин Е.А., Козубек С. Стабильные и нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека *in vitro* после  $\gamma$ -облучения// Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996, Т.36, вып. 6. – С. 848 – 851.
11. Севанькаев А.В., Деденков А.Н. Актуальные проблемы современной радиобиологии в свете оценки и прогноза последствий аварии на ЧАЭС// Радиобиология. – 1990. – Т.30, вып. 5. – С. 579 – 584.
12. Севанькаев А.В., Моисеенко В.В., Цыб А.Ф. Возможности применения методов биологической дозиметрии для ретроспективной оценки доз в связи с последствиями аварии на Чернобыльской АЭС. Оценка доз на основе анализа нестабильных хромосомных aberrаций// Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т.34, вып. 6. – С. 782 – 792.
13. Севанькаев А.В., Моисеенко В.В., Цыб А.Ф. Возможности применения методов биологической дозиметрии для ретроспективной оценки доз в связи с последствиями аварии на Чернобыльской АЭС. Оценка доз на основе анализа стабильных хромосомных aberrаций// Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т.34, вып. 6. – С. 793 – 797.
14. Снегирева Г.П., Богомазова А.Н., Новицкая Н.Н., Федоренко Б.С., Хазинс Е.Д. Опыт применения цитогенетического метода в радиационных исследованиях// Вестник Российской Военно-медицинской Академии Приложение I. – 2008. - № 3 (23). – С. 184 – 185.
15. Lucas J.N., Hill F.S., Burk C.E., Cox A.B. Straume T. Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys// Int. J. Radiat. Biol. – 1996. – 70, № 3. – С. 309 – 318.
16. Thierens H. Biological dosimetry using micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response// Health Phys. – 1991. – 61, № 5. – P. 623 – 630.