

УДК [57+61]::539.1.047:575.224:23

ХРОМОСОМНЫЙ И ЦИТОМНЫЙ АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК РАБОТНИКОВ РАДИОХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА С ИНКОРПОРИРОВАННЫМ ^{239}Pu

© 2010 г. В. А. Тимошевский*, И. Н. Лебедев, С. А. Васильев, Н. Н. Суханова, Ю. С. Яковлева, Н. Б. Торхова, В. П. Пузырёв

Учреждение Российской академии медицинских наук

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения РАН, Томск

Проведено комплексное исследование хромосомных нарушений у персонала радиохимического производства с инкорпорированным ^{239}Pu с применением технологии анализа рутинно и дифференциально окрашенных метафазных хромосом, а также методов интерфазного FISH-исследования анеугенных и кластогенных повреждений с использованием центромерспецифичных ДНК-зондов на цитокинез-блокированных двухъядерных клетках. Полученные данные впервые свидетельствуют как о кластогенном, так и об анеугенном влиянии инкорпорированного ^{239}Pu в диапазоне активности от 0.37 до 6.95 кБк на хромосомный аппарат соматических клеток человека. Анализ соотношений частот хромосомных aberrаций с нарушениями цитостаза позволил установить значимую связь между рядом показателей метафазного и интерфазного исследований. Результаты проведенного исследования поддерживают гипотезу о том, что в процессы анеугенеза вовлекаются преимущественно aberrантные хромосомы. Показано, что определение хромосомных повреждений в двухъядерных клетках позволяет расширить спектр выявляемых хромосомных нарушений, а также детализировать характер мутагенного влияния исследуемого фактора с учетом механизмов генерации анеуплоидии. Хорошая согласованность результатов метафазного и интерфазного анализа свидетельствует о высокой информативности FISH-исследования цитокинез-блокированных двухъядерных клеток, который может использоваться как самостоятельный тест для определения кластогенных и анеугенных эффектов факторов внешней среды.

Анеуплоидия, интерфазный FISH-анализ, ^{239}Pu , хромосомные aberrации, хромосомное нерасхождение, хромосомное отставание, цитокинез-блокированные лимфоциты, цитом.

Исследование закономерностей возникновения хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови широко используется для определения характера мутационного процесса в соматических клетках человека. Отдельный интерес представляет спектр и частота хромосомных нарушений, индуцированных плотнo-ионизирующим α -излучением у работников, связанных с радиохимическим производством. Для определения характера и степени радиационного воздействия долгое время применяется метод учета хромосомных aberrаций, которые являются общепризнанным индикатором такого рода мутагенных влияний [1, 2]. В мировой практике определения генетических повреждений также широко используется анализ двухъядерных цитокинез-блокированных лимфоцитов как способ исследования “цитостаза” с возможностью определения частоты микроядер, уровня клеточной гибели и митотической дис-

функции [3, 4]. Под “цитостазом” подразумевается совокупность характеристик клетки, включающая ее витальный (некроз, апоптоз) и митотический (микроядра, метафаза, анафаза, однодвухъядерность) статус, а также состояние хромосомной целостности (наличие микроядер, нуклеосомных мостов, ядерных почечек, распределения хромосомспецифичных сигналов). Гибридизация с использованием флуоресцентных ДНК-зондов на двухъядерных клетках позволяет определять частоту анеугенных событий: нерасхождения и отставания отдельных хромосом.

Необходимость детекции анеугенной компоненты воздействия продиктована колоссальным мутагенным потенциалом анеуплоидии как генетического нарушения, играющего ключевую роль в злокачественной трансформации клеток и клональной эволюции неоплазии [5, 6]. Нарушения в точном механизме распределения хромосом по дочерним клеткам приводят к образованию микроядер и анеуплоидии. Кроме того, перестроенные хромосомы также могут быть подвержены

* Адресат для корреспонденции: 634050 Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, НИИ МГ СО РАН; тел.: (3822) 51-31-46; e-mail: vladimir.timoshevsky@medgenetics.ru.

ошибочному распределению в ходе клеточного деления. Таким образом, определение генетических эффектов следует проводить, во-первых, с учетом возможного кластогенного воздействия, и, во-вторых, принимать во внимание, что тестируемый фактор может вызвать геномные мутации. Цель настоящей работы – оценка генетических эффектов инкорпорированного ^{239}Pu с помощью комплексного анализа структурных и числовых хромосомных нарушений у работников радиохимического производства. Особый интерес представляла оценка возможной взаимосвязи между хромосомными aberrациями с нарушениями “цитомы” с целью определения отношения структурных и числовых хромосомных аномалий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для оценки частоты и спектра хромосомных нарушений был обследован персонал металлургического завода ОАО “Сибирский химический комбинат” (г. Северск Томской области), в качестве контрольной группы представлены жители города Северска, не связанные с радиохимическим производством. Возраст работников составлял от 38 до 70 лет (среднее 57 лет), содержание ^{239}Pu в организме варьировало от 0.37 до 6.95 кБк (10–188 нКи). Контрольная группа состояла из индивидов без зарегистрированного влияния ионизирующей радиации в возрасте от 31 до 69 лет (среднее 53 года). Цитогенетический анализ рутинно окрашенных хромосом был проведен у 66 работников и 25 человек контроля, анализ дифференциально окрашенных хромосом у 56 и 24 человек соответственно, анализ цитохалазин-блокированных лимфоцитов в комбинации с FISH на хромосомы 2, 7, 8, 12, X и Y у 30 работников и 30 человек из контрольной группы. От каждого индивида было получено информированное согласие на проведение генетического исследования, а также были собраны анкетные данные о возможных бытовых мутагенных воздействиях, вредных привычках, перенесенных заболеваниях и принимаемых лекарственных препаратах. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН.

Исследования проводились по стандартному критерию оценки частоты хромосомных aberrаций, выявляемых в первом митозе после ФГА-стимуляции лимфоцитов [7]. Учитывались все типы хромосомных аномалий, распознаваемых на рутинно и дифференциально окрашенных хромосомах. У каждого индивида анализировали порядка 300 рутинно окрашенных метафаз и 100 пластинок с дифференциальной окраской. Для получения цитокинез-блокированных лимфоцитов после 48 ч культивирования в культуру клеток добавляли цитохалазин В в количестве

5 мкг/мл. Через 72 ч после начала культивирования начинали процедуру фиксации [8].

Реакцию флуоресцентной гибридизации *in situ* проводили по стандартной методике с незначительными модификациями [9, 10]. ДНК-зонды получали методом ник-трансляции плазмидной ДНК *E.coli*, содержащей вставки соответствующих центромероспецифичных фрагментов альфа-сателлитной ДНК человека. Для мечения использовали дезоксирибонуклеотидтрифосфаты с флуоресцирующими молекулами: флуоресцеин-12-дУТФ и Tamra-5-дУТФ. Для денатурации зондов и хромосомной ДНК, а также для последующей гибридизации *in situ* использовали программируемый термостат “ThermoBrite” (“Abbott Molecular”, США). Денатурацию проводили нагреванием в течение 2 мин при 75°C, после чего инкубировали препараты для гибридизации ДНК-зондов с хромосомными мишенями в течение ночи (15–18 ч) при 37°C. Для проведения FISH-анализа использовали центромероспецифичные зонды в следующих сочетаниях: 2 и 8, 12 и 7, Y и X, меченные соответственно Tamra-5-дУТФ и флуоресцеин-12-дУТФ. После отмывок в буферах $0.4 \times \text{SSC}$, 0.3% NP-40 при 70°C в течение 2 мин и $2 \times \text{SSC}$, 0.1% NP-40 при 37°C в течение 5 мин, препараты окрашивали DAPI в конечной концентрации 0.3 мкмоль/л и заключали в буфер для микроскопирования, содержащий антиокислительный агент DABCO. Анализ распределения флуоресцентных сигналов вели на микроскопе “Axioskop” (Carl Zeiss), при увеличении в 1200 раз. Частоту аномальных сегрегационных событий для каждой пары анализируемых на одном препарате хромосом оценивали в 1000 двухъядерных клеток, в которых проводили учет микроядер [3, 11]. Математическую обработку данных проводили с помощью следующих методов прикладной статистики: разницу средних оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа, корреляционную связь между переменными выявляли с помощью рангового критерия Спирмена и γ -теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения частоты структурных aberrаций у одних и тех же лиц были проанализированы как рутинно окрашенные хромосомы, так и метафазные пластинки с G-бендингом. Возникающие в клетках хромосомные aberrации обычно выявляются с помощью стандартного цитогенетического анализа рутинно окрашенных хромосом [12]. В табл. 1 приведены средние показатели по частоте хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови обследованных лиц с инкорпорированным ^{239}Pu по данным анализа рутинно окрашенных хромосом. Среди поврежденных хромосом встречаются aberrации как хромосомного, так и хроматидного типов. Сравнение

Таблица 1. Средняя частота хромосомных aberrаций ($\% \pm$ ст. ошибка среднего) в лимфоцитах периферической крови у работников плутониевого производства с различной дозой нагрузки по данным анализа рутинно окрашенных метафаз

Группа	Работники	Контроль	<i>p</i> для разницы средних
Число индивидов	66	25	
Число исследованных метафаз	19 103	7430	
Процент aberrантных метафаз	1.46 \pm 0.11	0.83 \pm 0.13	0.002
Aberrации хромосомного типа	0.86 \pm 0.10	0.33 \pm 0.12	0.003
Aberrации хроматидного типа	0.75 \pm 0.08	0.55 \pm 0.11	0.180
Число aberrаций на 100 клеток	1.63 \pm 0.13	0.87 \pm 0.14	0.006
Парные фрагменты	0.55 \pm 0.08	0.19 \pm 0.07	0.010
Кольцевые хромосомы	0.08 \pm 0.03	0.07 \pm 0.03	0.824
Дицентрические хромосомы	0.13 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.126
Делеции	0.06 \pm 0.02	—	0.034
Одиночные разрывы	0.37 \pm 0.05	0.34 \pm 0.08	0.731
Изохроматидные разрывы	0.24 \pm 0.05	0.16 \pm 0.06	0.381
Хроматидные обмены	0.10 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.282
Мультиaberrантные клетки	0.03 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.601
Клетки с двойными минихромосомами	0.07 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.244

показателей основной и контрольной групп позволило выявить статистически значимые отличия по частоте aberrантных метафаз, aberrаций хромосомного типа и парных фрагментов. Несмотря на значимые отличия частоты aberrантных метафаз в основной группе по сравнению с контролем, исходя из наших предыдущих данных, а также общепопуляционного уровня хромосомных aberrаций, средняя частота aberrантных метафаз как у работников производства, так и в контроле не превышает спонтанной величины [13, 14].

Считается, что нестабильные двухударные хромосомные aberrации (дицентрические и кольцевые хромосомы) являются надежным и наиболее чувствительным биологическим маркером индивидуальной дозовой нагрузки на все тело в случае недавнего острого облучения [15], тогда как стабильные хромосомные aberrации, сохраняясь длительное время в клетках-предшественниках и лимфоцитах периферической крови, могут служить биомаркерами для ретроспективной оценки доз облучения [16, 17]. Обращает на себя внимание факт отсутствия значимого увеличения частоты двухударных хромосомных aberrаций у работников с инкорпорированным ^{239}Pu , что в целом свидетельствует об отсутствии существенного радиационного воздействия.

У работников с повышенной частотой хромосомных нарушений преобладают aberrации хромосомного типа, что характерно для исследуемого мутагенного фактора — плотно-ионизирующего излучения инкорпорированного ^{239}Pu . Именно aberrации хромосомного типа — преимущественно

парные фрагменты — вносят основной вклад в различия основной и контрольной групп. Проходя через клетки-мишени α -частицы вызывают двойные разрывы ДНК, что и приводит к формированию aberrаций хромосомного типа. Таким образом, характер наблюдаемой цитогенетической картины в лимфоцитах периферической крови у работников СХК при действии инкорпорированного плутония можно объяснить, исходя из физических свойств исследуемого изотопа. В то же время нельзя утверждать, что воздействие изучаемого фактора вносит драматические изменения в генетический аппарат клеток, приводя к какому-либо существенному увеличению уровня хромосомных aberrаций.

Для выявления стабильных aberrаций более информативным является анализ дифференциально окрашенных хромосом. Выбор этого метода анализа обусловлен тем, что большинство литературных данных свидетельствует о том, что генетические эффекты инкорпорированного плутония не приводят к видимым изменениям в отношении индукции нестабильных aberrаций [18–20], что наблюдалось и нами в настоящем исследовании. С помощью анализа G-окрашенных хромосом можно идентифицировать транслокации, а также более детально исследовать делеции. В табл. 2 приведены показатели спектра и частоты обнаруженных хромосомных aberrаций по данным анализа G-окрашенных хромосом. Аналогично ситуации с рутинно окрашенными хромосомами, кариотипирование G-окрашенных хромосом позволило выявить различия основной

Таблица 2. Средняя частота хромосомных aberrаций ($\% \pm$ ст. ошибка среднего) в лимфоцитах периферической крови у работников плутониевого производства с различной дозой нагрузки по данным анализа дифференциально окрашенных метафаз (G-бендинг)

Группа	Работники	Контроль	<i>p</i> для разницы средних
Число индивидов	56	24	
Число исследованных метафаз	6788	2198	
Процент aberrантных метафаз	2.54 \pm 0.43	1.00 \pm 0.24	0.028
Aberrации хромосомного типа	2.48 \pm 0.45	0.61 \pm 0.22	0.011
Aberrации хроматидного типа	0.63 \pm 0.16	0.39 \pm 0.12	0.357
Число aberrаций на 100 клеток	2.58 \pm 0.40	0.99 \pm 0.25	0.018
Парные фрагменты	0.41 \pm 0.14	0.04 \pm 0.04	0.109
Кольцевые хромосомы	0.04 \pm 0.03	0.04 \pm 0.04	0.871
Дицентрические хромосомы	0.18 \pm 0.06	0.09 \pm 0.06	0.389
Делеции	0.80 \pm 0.10	0.04 \pm 0.04	0.014
Транслокации	0.93 \pm 0.24	0.43 \pm 0.15	0.212
Одиночные разрывы	0.43 \pm 0.12	0.22 \pm 0.11	0.291
Изохроматидные разрывы	0.16 \pm 0.06	0.09 \pm 0.06	0.440
Хроматидные обмены	0.04 \pm 0.03	—	0.365
Мультиaberrантные клетки	0.05 \pm 0.03	—	0.259
Клетки с двойными минихромосомами	0.02 \pm 0.02	—	0.521

группы с контролем по частоте aberrантных метафаз, числу aberrаций в пересчете на 100 клеток, уровню aberrаций хромосомного типа, а также по частоте делеций.

Следует отметить, что большинство атипичных хромосом, которые относятся к aberrациям стабильного типа, были выявлены в настоящем исследовании только с применением дифференциального окрашивания хромосом. Кариотипирование позволило зарегистрировать довольно существенные отличия по частоте делеций между сравниваемыми группами. Этот показатель вносит заметный вклад в межгрупповые различия, которые в целом определяются aberrациями хромосомного типа, характерными для клеток, подвергающихся действию излучения с высокой линейной передачей энергии. Частота клеток, несущих aberrации, выявленных с помощью кариотипирования дифференциально окрашенных хромосом, оказывается значительно выше ($p = 0.047$), чем та же величина, полученная при анализе хромосом с рутинной окраской. В то же время средний показатель для основной группы (2.54%), несмотря на значимые различия с контрольной величиной, сопоставим с уровнем спонтанных aberrаций в лимфоцитах человека [13].

Вместе с тем обращает на себя внимание присутствие в основной группе работников с инкорпорированным ^{239}Pu индивидов с довольно высоким уровнем хромосомных aberrаций (от 3 до 10% aberrантных метафаз), выявленных при ана-

лизе G-окрашенных хромосом. Факт существенных межиндивидуальных различий позволяет сделать предположение о ведущей роли в защите клеток от хромосомного дисбаланса индивидуальных генетических особенностей систем репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков и иммунной защиты организма. О неоднозначной связи полученной дозы внутреннего облучения с частотой хромосомных aberrаций свидетельствует также преимущественное отсутствие корреляции этих показателей в исследованной группе работников. Единственным показателем, продемонстрировавшим слабую, но статистически значимую корреляцию с дозой при исследовании рутинно окрашенных метафаз, оказалась частота кольцевых хромосом (коэффициент корреляции Спирмена, $r = 0.31$) — aberrаций нестабильного типа, являющихся маркером радиационного воздействия. При анализе дифференциально окрашенных хромосом дозовая зависимость была выявлена для частоты парных фрагментов ($r = 0.27$), а при использовании менее консервативных критериев (гамма-статистика) — для парных фрагментов ($r = 0.36$), кольцевых хромосом ($r = 0.79$), двойных минихромосом ($r = 0.96$) и мультиaberrантных клеток ($r = 0.67$). Можно предположить, что из всех перечисленных показателей только мультиaberrантные клетки характерны для аномалий, индуцируемых излучением с высокой линейной передачей энергии [21]. Это позволяет предположить, что при высоких дозах внутреннего облучения повышается вероятность возникно-

Таблица 3. Средние значения частоты нерасхождения и отставания хромосом в исследованных группах (% ± ст. ошибка)

Хромосома	Работники СХК		Контроль	
	нерасхождение	отставание	нерасхождение	отставание
2	2.32 ± 0.32*	0.12 ± 0.09	1.1 ± 0.19	0.06 ± 0.04
7	1.85 ± 0.36*	0.42 ± 0.14*	0.97 ± 0.16	0.06 ± 0.06
8	2.80 ± 0.49*	0.08 ± 0.06	0.84 ± 0.17	0.06 ± 0.04
12	2.30 ± 0.33*	0.42 ± 0.24	0.94 ± 0.18	0.09 ± 0.06
X	2.00 ± 0.37	0.67 ± 0.21	1.85 ± 0.35	1.1 ± 0.2
Y	1.52 ± 0.27*	0.33 ± 0.27	0.27 ± 0.2	0.4 ± 0.12
Микроядра	7.78 ± 0.69*		5.48 ± 0.40	

Примечание. * – Значимые отличия основной и контрольной групп.

вения клеток с нестабильными абберациями, а нарушение механизмов поддержания генетического баланса ввиду более сильных повреждений приводит к появлению клеток с множественными абберациями. Возможно, в случае с ^{239}Pu необходимо более детальное исследование дозовой зависимости для выявления генетически опасного уровня содержания данного изотопа в организме.

Обращает на себя внимание также факт обнаружения у 6 индивидов основной группы и 1 из контрольной клеток с двойными минихромосомами (dmin). Мы полагаем, что это указывает на определенные закономерности в отношении действия инкорпорированного ^{239}Pu . Литературные данные позволяют выдвинуть предположение, что наличие двойных минихромосом может свидетельствовать о начальном периоде трансформации клеток [22, 23]. Несомненно, что работники предприятия, у которых найдены клетки с двойными минихромосомами, должны периодически тщательно обследоваться для раннего выявления возможной онкопатологии.

Интерфазный анализ анеугенных и кластогенных нарушений был проведен с помощью молекулярно-цитогенетического исследования методом FISH. При постановке FISH с центромеро-специфичными пробами на отдельные хромосомы набора на двухъядерных цитокинез-блокированных лимфоцитах возможны следующие варианты распределения сигналов в дочерних ядрах: нормальное (по два сигнала в каждом ядре) и несколько типов аномального распределения, являющихся результатом различных нарушений сегрегации хромосом. Отставание сестринских хроматид в анафазе митоза приводит к гипоплоидии в одном из дочерних ядер и образованию микроядра (МЯ) с целой отставшей хроматидой (сочетание сигналов 2–1-МЯ1). Другим типом нарушения в митозе является хромосомное нерасхождение, в результате которого в одно из дочерних ядер отходит целая хромосома, состоящая из двух

сестринских хроматид. В этом случае в одном из дочерних ядер наблюдается гипер-, а в другом – гипоплоидия (сочетание сигналов 3–1). Также отмечаются редкие случаи двойного нерасхождения по одной хромосоме (4–0). В случае половых хромосом, учитывая их однокопийность у индивидов мужского пола, регистрировалось только аномальное распределение 0–2, соответствующее нерасхождению по одному гомологу. Отмечались также более сложные нарушения, являющиеся комбинацией приведенных выше.

В группе работников предприятия, по сравнению с необлученной контрольной группой, была выявлена значимо более высокая частота нерасхождения по хромосомам 2 ($p = 0.0066$), 7 ($p = 0.014$), 8 ($p = 0.009$) и 12 ($p = 0.0006$) (табл. 3). По частоте нерасхождения гоносом в группе работников СХК значимо более высокая частота, по сравнению с контрольной группой, была зарегистрирована только для хромосомы Y ($p = 0.034$). Частота нерасхождения по хромосоме X не отличалась значимо в группе работников и контрольной группе. Для частоты микроядер с одним центромерным сигналом значимые отличия между группой работников и контрольной группой наблюдались только для хромосомы 7 ($p = 0.018$).

Последствия хромосомного нерасхождения являлись преобладающими, составляя для аутосом в среднем 81–97% от частоты всех выявленных хромосомных аномалий в группе работников плутониевого производства и 91–94% в контрольной группе. Для хромосомы Y доля нерасхождения достигала 82% от всех хромосомных аномалий в группе работников и 68.3% в контрольной группе, а для хромосомы X – 75 и 64% соответственно.

Ранее исследование влияния ионизирующего излучения на уровень анеуплоидии в соматических клетках человека с помощью FISH с центромеро-специфичными ДНК-зондами на отдельные хромосомы набора проводилось лишь при

воздействии рентгеновского излучения *in vitro* на культивированные лимфоциты периферической крови [24]. При этом были обнаружены значимые отличия частоты анеуплоидии по хромосоме 17 при воздействии на клетку рентгеновского излучения в дозе более 1 Гр по сравнению с контролем. По хромосоме 1, анализируемой параллельно в том же исследовании, значимых отличий при воздействии ионизирующего излучения, по сравнению с контролем, обнаружено не было. Позднее той же группой исследователей при воздействии γ -излучения на культивированные лимфоциты периферической крови человека с помощью FISH с центромеро-специфичными ДНК-зондами на те же хромосомы (1 и 17) было продемонстрировано значимое увеличение частоты нерасхождения по обеим хромосомам в облученных клетках при дозе 2 Гр (27.00–34.38%) по сравнению с контролем (6.34–9.89%) [25]. При этом общая частота нерасхождения по всем хромосомам набора, экстраполированная на основе данных по хромосомам 1 и 17, в 10–20 раз превышала частоту отставания по всем хромосомам, что хорошо согласуется с полученными нами данными.

К настоящему моменту в большей части исследований, связанных с изучением анеугенного эффекта ионизирующего излучения, рассматривается в основном явление хромосомного отставания, при этом нерасхождению хромосом не уделяется достаточного внимания [24]. Однако значительное преобладание нерасхождения, как механизма возникновения анеуплоидии, не только у работников СХК, но и у индивидов контрольной группы демонстрирует, что анализ частоты нерасхождения хромосом в качестве маркера анеугенного воздействия может использоваться для более детального изучения механизмов возникновения анеуплоидии.

Оценка взаимосвязи структурных хромосомных aberrаций с показателями интерфазного FISH-анализа представляет интерес как с точки зрения характеристики методической воспроизводимости тестов, так и с позиции изучения взаимодействия генетических нарушений, имеющих различные механизмы генерации. Для выявления соотношения частоты хромосомных aberrаций с показателями интерфазного FISH-исследования был применен анализ корреляций с помощью непараметрических критериев оценки. В табл. 4 приведены значения корреляционной связи между различными типами нарушений, которые были выявлены с помощью принципиально различающихся подходов, выполненных независимо друг от друга: метафазного анализа aberrантных хромосом и интерфазного FISH-анализа двухъядерных цитокинез-блокированных клеток. Исходя из выявленных корреляций, прослеживается отчетливая связь между показателями, получен-

ными различными цитогенетическими методами. В связи с этим следует отметить, что некоторые выявленные корреляционные отношения свидетельствуют о хорошей воспроизводимости методик. Например, частота парных фрагментов связана с частотой микроядер, что логично следует из известных механизмов образования микроядер из потерянных ацентрических хромосомных сегментов [3, 4]. Кроме того, на основе связи aberrаций различного типа с различными анеугенными событиями можно подтвердить гипотезу о преимущественном вовлечении в процесс анеугенеза aberrантных хромосом [26]. Так как с показателями числовых хромосомных нарушений, а именно с частотой нерасхождения, связаны большей частью aberrации хромосомного типа, то можно также предположить участие в процессах анеугенеза хромосом, вовлеченных в процессы репарации путем гомологичной рекомбинации. Возможно, сайты рекомбинации служат предрасполагающим фактором к нерасхождению поврежденных хромосом.

Кроме того, можно предположить и существование обратной связи – анеуплоидия также может способствовать появлению структурных нарушений. Это следует из концепции автокаталитического действия хромосомного дисбаланса в отношении индукции дальнейших нарушений, усугубляющих аномальное число и экспрессию множества генов, которая активно прорабатывается с середины 1990-х годов [5]. Одно из положений анеуплоидной концепции канцерогенеза состоит в том, что нарушение дозы, т.е. степени проявления, сотен и тысяч генов, которое возникает при анеуплоидии, является движущим фактором дальнейшей прогрессии генетических нарушений в ряду клеточных поколений. Хромосомный дисбаланс, вызванный полной или сегментной (при хромосомных aberrациях обменного типа, дупликациях и делециях) анеуплоидией, приводит к аномальной экспрессии генов репарации ДНК, регуляторных и структурных генов клеточного цикла и сегрегации хромосом. Такие нарушения, в свою очередь, являются фактором возникновения структурных хромосомных aberrаций. Таким образом, положение о взаимосвязи и взаимозависимости кластогенных и анеугенных повреждений генома подтверждается настоящим исследованием корреляционной связи этих типов нарушений.

В научной литературе имеются единичные сообщения о корреляции между нарушениями “цитотома”, т.е. аномальной морфологией двухъядерных клеток и структурными хромосомными aberrациями. Такая связь была показана в недавнем исследовании действия низких доз радона (10–100 мГр) на культуры лимфоцитов человека [27]. Авторы выявили достоверную зависимость между нуклеоплазменными мостами и дицентриками,

Таблица 4. Корреляционные соотношения показателей метафазного и интерфазного FISH-анализов (ранговый коэффициент корреляции Спирмена)

Коррелирующие показатели		Коэффициент корреляции, $p < 0.05$
метафазный анализ	интерфазный FISH-анализ	
Аберрации хромосомного типа (р)	Частота микроядер	0.51
	Суммарная средняя частота нерасхождения и отставания	0.46
	Общая частота нерасхождения	0.45
	Средняя частота нерасхождения	0.51
Кольцевые хромосомы (р)	Суммарная средняя частота нерасхождения и отставания	0.35
Парные фрагменты (р)	Частота МЯ	0.40
Делении (р)	Суммарная частота нерасхождения	0.36
	Средняя частота отставания	0.33
	Суммарная частота отставания	0.34
	Сумма средней частоты отставания и нерасхождения	0.40
Двойные минихромосомы (р)	Частота МЯ	0.46
	Суммарная частота нерасхождения	0.53
Аберраций на 100 клеток (р)	Частота МЯ	0.32
Аберрации хромосомного типа (д)	Сумма средней частоты отставания и нерасхождения	0.40
	Частота МЯ	0.38
Парные фрагменты (д)	Частота МЯ	0.39
Одиночные разрывы (д)	Средняя частота отставания	0.38
	Суммарная частота отставания	0.39
Делении (д)	Сумма средней частоты отставания и нерасхождения	0.37
МАК (д)	Средняя частота отставания	0.38
	Суммарная частота отставания	0.38

Примечание. (р) – исследование рутинно окрашенных хромосом, (д) – анализ хромосом с дифференциальной окраской, МАК – мультиабберрантные клетки.

мостами и кольцевыми хромосомами, а также микроядрами и ацентрическими фрагментами. Таким образом, обнаруженные нами корреляции при исследовании действия α -частиц в системе *in vivo* подтверждаются аналогичными исследованиями *in vitro*. Следует отметить, что в отличие от работы [27], мы практически не выявляли нуклеоплазменных мостов, что согласуется в нашем случае с отсутствием достоверных различий по частоте дицентриков между основной группой и контрольной. Это объясняется тем, что возрастание частоты нестабильных аберраций нехарактерно для изучаемого нами явления – действия инкорпорированного плутония *in vivo* [18]. В другой работе была показана корреляция между частотой появления фрагильных сайтов на хромосомах и содержанием микроядер у пациентов, употребляющих антигипертензивный препарат антенолол [28].

Следует отметить, что продемонстрированная нами связь хромосомных аберраций с нарушениями “цитома” вполне ожидаема, исходя из данных о механизмах возникновения микроядер и других нарушений морфологии двухъядерных клеток, так как генетические нарушения зависят от целого ряда комплексного действия эндогенных и экзогенных факторов. Мутагенные факторы способны индуцировать различные цитогенетические нарушения, которые вовлечены в формирование микроядер, частота которых связана с уровнем некроза и апоптоза [29, 30], а также уровнем белка p53 [31]. Кроме того, не только токсические агенты способны индуцировать генетические нарушения: “цитомные” нарушения зависят также от возраста и даже диеты (уровня фолатов, витаминов B₁₂, E, гомоцистеинового статуса) [32]. Появление микроядер отражает интегрированный клеточный ответ при фенотипе с хромо-

сомной нестабильностью, вызванной генетическими дефектами или экзогенными воздействиями. Формирование этого фенотипа связано также со статусом систем репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков и фолатов [33, 34].

Значимая связь частоты хромосомных aberrаций с показателями интерфазного анализа затрагивает также существенную сторону практического применения молекулярно-генетических технологий для анализа генотоксического воздействия, а именно возможности замены трудоемкой и длительной процедуры метафазного анализа на подход, предусматривающий исследование двухъядерных клеток в комбинации с методом FISH. За исключением биологической дозиметрии радиационного воздействия, в частности ^{239}Pu , которая нуждается в регистрации сбалансированных наследуемых транслокаций, технология определения “цитомных” нарушений может оказаться довольно информативным подходом для определения генетических эффектов производственных факторов. Таким образом, данный подход может рассматриваться не только как дополнительный метод токсикологических исследований, но и как самостоятельная тест-система регистрации мутагенных воздействий.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке государственных контрактов Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009-2013 гг. (№ П11707, П11748 и П11080).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- International Atomic Energy Agency. Biological dosimetry: chromosome aberration analyses for dose assessment. Vienna: IAEA, 1986. 69 p.
- Bender M.A., Awa A.A., Brooks A.L. et al. // *Mutat. Res.* 1988. V. 196. P. 153–159.
- Fenech M. // *Mutat. Res.* 2006. V. 600. P. 58–66.
- Fenech M. // *Meth. Mol. Biol.* 2008. V. 410 P. 185–216.
- Duesberg P., Rasnick D. // *Cell Motility and Cytoskeleton.* 2000. V. 47. P. 81–107.
- Williams B.R., Amon A. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 5289–5291.
- Sasaki M.S., Norman A. // *Nature.* 1967. V. 214. P. 502–503.
- Fenech M. // *Nature Protocols.* 2007. V. 2. P. 1084–1104.
- Rooney D.E., Czepulkowski B.H. // *Human cytogenetics: A practical approach.* 1. Oxford: Oxford Univ. Press, 1992. 274 p.
- Тимошевский В.А., Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий: анализ числовых хромосомных нарушений в интерфазных клетках человека (Серия: Наследственность и здоровье. Вып. 7): Учебное пособие для интернов, ординаторов и слушателей курсов последипломной подготовки / Под ред. В.П. Пузырева. Томск: Печатная мануфактура, 2006. 38 с.
- Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J. et al. // *Mutat. Res.* 2006. V. 607. P. 13–36.
- Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. // *Наследственность человека и мутагены внешней среды.* М.: Медицина, 1989. 272 с.
- Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И. // *Генетика.* 2001. V. 37. № 4. P. 549–557.
- Назаренко С.А., Попова Н.А., Назаренко Л.П., Пузырев В.П. // *Ядерно-химическое производство и генетическое здоровье.* Томск: Печатная мануфактура, 2004. 272 с.
- Voisin P., Barquinero F., Blakely B. et al. // *Cell. Mol. Biol.* 2002. V. 48. № 5. P. 501–504.
- Bauchinger M., Salassidis K., Braselmann H. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. V. 73. P. 605–612.
- Kanda R. // *J. Radiat. Res.* 2000. V. 41. P. 1–8.
- Whitehouse C.A., Tawn E.J., Riddell A.E. // *Radiat. Res.* 1998. V. 150. P. 159–168.
- Tawn E., Whitehouse C., Tarone R. // *Radiat. Res.* 2004. V. 162. P. 249–256.
- Tawn E., Whitehouse C. // *J. Radiol. Prot.* 2005. V. 25. P. 83–88.
- Чеботарев А.Н. // *Докл. РАН.* 2000. Т. 371. С. 847–849.
- Bruckert P., Kappler R., Scherthan H. et al. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000. V. 120. P. 73–79.
- Govberg I.J., Wolf J.L., Cotter P.D. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000. V. 121. P. 212–215.
- Kirsch-Volders M., Tallon I., Tanzarella C. et al. // *Mutagenesis.* 1996. V. 11. № 4. P. 307–313.
- Touil N., Elhajouji A., Thierens H., Kirsch-Volders M. // *Mutagenesis.* 2000. V. 15. P. 1–7.
- Aardema M.J., Albertini S., Arni P. et al. // *Mutat. Res.* 1998. V. 410. P. 3–79.
- Hamza V.Z., Mohankumar M.N. // *Mutat. Res.* 2009. V. 661. P. 1–9.
- Telez M., Ortiz-Lastra E., Gonzalez A.J. et al. // *Mutat. Res.* 2010. V. 695. P. 46–54.
- Kirsch-Volders M., Fenech M. // *Mutagenesis.* 2001. V. 16. № 1. P. 51–58.
- Gul S., Savsar A., Tayfa Z. // *Cytotechnology.* 2009. V. 59. P. 113–119.
- Salazar A., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. // *Mutat. Res.* 2009. V. 672. № 2. P. 124–128.
- Fenech M. // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 1998. V. 854. P. 23–36.
- Kirsch-Volders M., Mateuca R.A., Roelants M. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006. V. 15. № 5. P. 1038–1042.
- Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A. et al. // *Mutat. Res.* 2008. V. 658. P. 215–233.

Поступила в редакцию
15.06.2010

Chromosome and Cytome Assay of the Somatic Cells of Nuclear-Chemical Production Workers with Incorporated ^{239}Pu

**V. A. Timoshevskiy, S. A. Vasilyev, I. N. Lebedev, N. N. Sukhanova, Y. S. Yakovleva,
N. B. Torkhova, V. P. Puzyrev**

Scientific Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia;

e-mail: Vladimir.timoshevsky@medgenetics.ru

The analysis of plutonium production factors has been carried out by using two methodical approaches: assessment of chromosomal aberrations level in routine and G-banded metaphases and molecular-cytogenetic investigation of aneugenic/clastogenic damages in cytokinesis-block binuclear lymphocytes by FISH with centromere specific DNA probes. The obtaining data point out for the first time about both aneugenic and clastogenic influences of incorporated ^{239}Pu with activity range from 0.37 to 6.95 kBq. Correlation analysis of chromosome aberrations with cytome abnormalities allowed finding significant connection between number parameters of metaphase and interphase approaches. The results of this study support the suggestion that aberrant chromosomes are involved preferable in aneugenic events. The FISH technique in binucleated cytokinesis-blocked lymphocytes allows extending of detecting spectrum of chromosome damages and glance of aneugenic mechanisms. Correlations between metaphase and interphase-FISH results point out a high sensitivity of FISH cytome assay, which could be used as an independent test for detection both clastogenic and aneugenic environment influences.