

С.А. Васильев, В.А. Тимошевский, И.Н. Лебедев

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА АНЕУГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК: 575.224.234

Проблема оценки влияния ионизирующего излучения на организм человека в условиях профессиональной деятельности требует пристального внимания. Особую актуальность приобретают исследования, направленные на поиск новых информативных биомаркеров генотоксикологического воздействия. Таковыми потенциально могут выступать числовые нарушения хромосом, возникающие вследствие повреждения механизмов хромосомной сегрегации, в том числе и при непрямом действии ионизирующего излучения. Современные технологии молекулярно-цитогенетического анализа предоставляют уникальную возможность для регистрации анеугенных событий в соматических клетках человека. В настоящей работе показана возможность применения метода флуоресцентной *in situ* гибридизации на цитокинез-блокированных лимфоцитах периферической крови с использованием центромероспецифичных ДНК-зондов на отдельные хромосомы набора и панцентромерных ДНК-зондов для комплексной оценки влияния ионизирующего излучения на хромосомную сегрегацию. Установлены особенности анеугенных эффектов инкорпорированного плутония-239 в соматических клетках работников ядерно-химического производства.

Ключевые слова: анеуплоидия, цитогенетический мониторинг, ионизирующее излучение, плутоний-239.

Problem of assessment of occupational ionizing radiation influence on human organism requires special attention. As a result, investigations of new informative biomarkers of genotoxicological influence are particularly relevant. Numerical chromosomal abnormalities formed due to disruption of chromosome segregation machinery can be one of these markers. Modern technologies of molecular cytogenetic analysis provide a unique opportunity to register aneugenic events in human somatic cells. In *this* paper we have shown potential application of fluorescent *in situ* hybridization on cytokinesis-blocked lymphocytes of peripheral blood using centromere-specific DNA probes to individual chromosomes and pancentromeric DNA probes for complex assessment of ionizing radiation influence on chromosomal segregation. Special features of aneugenic effect of incorporated plutonium-239 in somatic cells of nuclear facility workers were revealed.

Keywords: aneuploidy, cytogenetic monitoring, ionizing radiation, plutonium-239.

Введение

Значимость оценки генотоксического влияния ионизирующего излучения на человека в условиях профессиональной деятельности в последние годы приобретает все большую актуальность. Во многом такая ситуация связана с ростом заинтересованности предприятий ядерной энергетики и ядерно-химической промышленности в повышении эффективности проводимых мероприятий по обеспечению биобезопасности персонала [1].

Хорошо известен кластогенный эффект ионизирующего излучения, выражающийся в повышении уровня структурных хромосомных aberrаций в клетках, что соответствует модели прямого действия на хромосомный материал. Однако также существуют и не прямые эффекты ионизирующего излучения, обусловленные образованием свободных радикалов кислорода и азота в результате вторичной ионизации молекул. Результатами подобного воздействия могут стать такие тяжелые для клетки генетические повреждения, как числовые нарушения хромосом. Значение анеуплоидии как аномального состояния генетического аппарата определяется, в первую очередь, нарушением дозы генов, локали-

зованных на недостающих или лишних гомологах [6]. Данное нарушение в соматических клетках может приводить к различным патологическим состояниям, в том числе и к опухолевой трансформации [4].

Несмотря на необходимость включения анализа частоты анеуплоидии в комплексную оценку действия ионизирующего излучения на генетический аппарат соматических клеток работников ядерно-химического производства, данная проблема остается слабо изученной [8]. С целью осуществления такого анализа, совмещающего в себе оценку одновременно класто- и анеугенного потенциала ионизирующего излучения, нами впервые было проведено исследование влияния инкорпорированного в организм плутония-239 на частоту структурных и числовых хромосомных аномалий в соматических клетках работников Сибирского химического комбината (СХК, г. Северск, Томской области). В качестве наиболее оптимального подхода для выполнения поставленной цели был применен метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с центромеро-специфичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X и Y. Использование в реакции FISH ДНК-зондов на прицентромерные области отдельных хромосом набора позволяет дифференцировать хромосомное нерасхождение и отставание, возникающие вследствие повреждения различных клеточных мишеней [7]. Кроме того, в настоящем исследовании был использован метод FISH с панцентромерными

ДНК-зондами. Данный подход позволяет оценить сравнительный вклад анеу- и кластогенного эффекта, благодаря анализу частоты микроядер с наличием флуоресцентных сигналов (микроядра, содержащие отставшие хроматиды с центромерной последовательностью) и их отсутствием (микроядра с хромосомными фрагментами). Более того, использование панцентромерных ДНК-зондов дает возможность получить интегральную оценку хромосомного отставания одновременно по всем гомологам в кариотипе человека. Наконец, проведение анализа на цитокинез-блокированных двухъядерных лимфоцитах позволяет существенно повысить информативность оценки анеугенных эффектов вследствие использования второго ядра в качестве контрольного при определении событий хромосомного нерасхождения и отставания.

Материалы и методы

Обследовано 27 работников СХК с наличием в организме инкорпорированного плутония-239, являющегося источником α -частиц. Контрольная группа включала 33 жителя г. Северска, не связанных в своей профессиональной деятельности с ядерно-химическим производством. Все обследованные индивиды обеих групп были мужского пола. Сравнимые группы были сопоставимы по возрастному составу (табл. 1). В исследование включались лица без грубой соматической патологии (злокачественные новообразования, аутоиммунные за-

болевания и др.). Все участники исследования подписали информированное согласие на свое участие в нем. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН. Для работников СХК администрацией предприятия была предоставлена информация об активности инкорпорированного плутония в организме, накопленного в течение профессиональной деятельности и определенной с помощью стандартной процедуры уринализа (табл. 1). Для проведения исследования методом FISH с панцентромерными ДНК-зондами из обеих групп случайным образом было взято по 20 индивидов.

Из образцов периферической крови осаждением выделялась лейкоцитарная масса. Культивирование лимфоцитов осуществлялось в течение 72 ч. На 44-м ч в культуру клеток добавлялся цитокинез-блокирующий агент цитохалазин В (Sigma, США) до концентрации 5 мкг/мл [5]. Полученные в результате культивирования двухъядерные клетки фиксировались на 72-м ч в модифицированном фиксаторе Карнуа (метанол : уксусная кислота, 3:1).

Клоны *E. coli* с плазмидами, содержащими вставки, специфичные для прицентромерного района определенной пары хромосом человека, были любезно предоставлены профессором Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Италия). Введение в ДНК-зонды флуоресцентной метки (TAMRA-dUTP или Fluorescein-dUTP) осуществлялось с помощью ник-трансляции. Для проведения двухцветной реакции FISH использовались пары ДНК-зондов на отдельные хромосомы набора (2 и 8, 7 и 12, X и Y), меченные флуорохромами двух разных цветов. Выбор хромосом для анализа был обусловлен их различиями в размерах, определяющими разную вероятность аномальной сегрегации, а также наличием информации о патогенетической значимости анеуплоидии по исследованным хромосомам в соматических клетках, прежде всего в отношении риска развития гемобластозов. Панцентромерные ДНК-зонды, гибридизующиеся с прицентромерными районами всех хромосом человека, были получены в результате смешивания ДНК-зондов для каждой пары хромосом. Постановка реакции FISH осуществлялась по протоколу, описанному нами ранее [2].

При использовании ДНК-проб на отдельные хромосомы набора для каждой пары зондов анализировали распределение гибридизационных

сигналов в 1000 двухъядерных клеток на одном препарате для каждого индивида. Для FISH с применением панцентромерных ДНК-зондов производилась оценка частоты встречаемости центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер в 2000 двухъядерных клеток. Примеры комбинаций флуоресцентных сигналов, обнаруживаемых в двухъядерных лимфоцитах периферической крови человека реакцией FISH с различными ДНК-зондами, приведены на рисунке. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью критерия Манна-Уитни для межгрупповых сравнений.

Результаты и обсуждение

Частота нерасхождения по всем исследованным хромосомам, за исключением X-хромосомы, оказалась значимо выше в группе работников СХК, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) (табл. 2). Частота отставания была значимо выше в группе работников СХК только для хромосомы 7, в то время как по частоте отставания по всем другим исследованным хромосомам значимых отличий обнаружено не было. Однако, учитывая очень малое количество клеток с хромосомным отставанием в обеих обследованных группах (табл. 2), данные отличия, скорее всего, были обусловлены случайными причинами. Среди всех проанализированных аномалий нерасхождение, как механизм возникновения анеуплоидии, регистрировалось гораздо чаще отставания, составляя от 81,4 до 97,2 % всех нарушений сегрегации

Таблица 1

Характеристика обследованных групп

Параметр	Контрольная группа	Группа работников СХК
FISH с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y		
Число индивидов	33	27
Средний возраст $\pm$ ст. ошибка (годы) (диапазон)	54 ± 2 (32-70)	58 ± 2 (38-71)
Средняя активность инкорпорированного Pu-239 $\pm$ ст. ошибка (Бк), (диапазон)	-	1287 ± 317 (370-6956)
Число проанализированных клеток	99000	81000
FISH с панцентромерными ДНК-зондами		
Число индивидов	20	20
Средний возраст $\pm$ ст. ошибка (годы) (диапазон)	53 ± 2 (36-70)	59 ± 2 (39-70)
Средняя активность инкорпорированного Pu-239 $\pm$ ст. ошибка (Бк) (диапазон)	-	1300 ± 351 (360-6768)
Число проанализированных клеток	40000	40000

Таблица 2

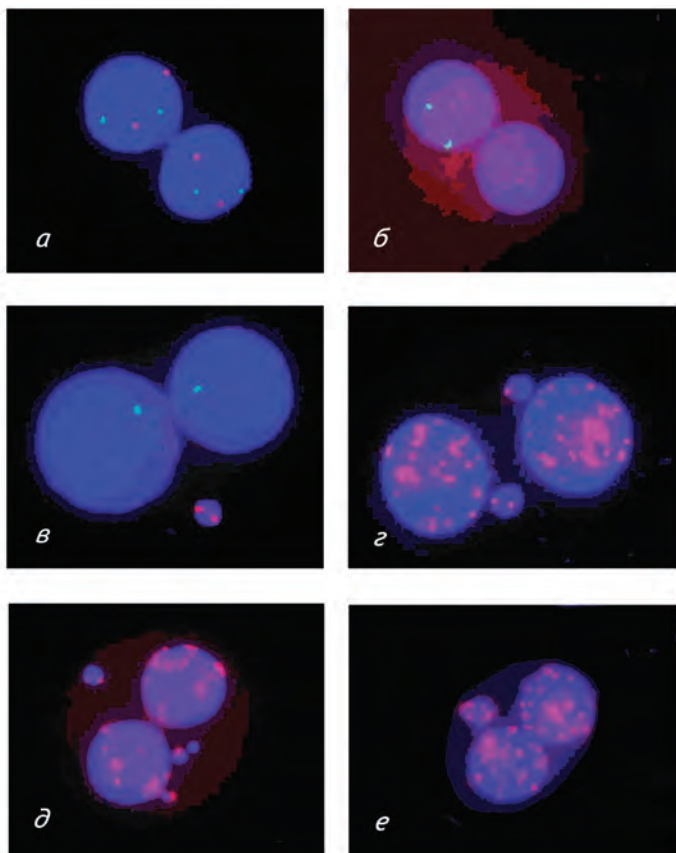
Частоты хромосомного нерасхождения, хромосомного отставания и микроядер в группе работников СХК и в контрольной группе (%)

Параметр	Контрольная группа	Группа работников СХК	Уровень значимости
FISH с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y			
Нерасхождение	2	$1,10 \pm 0,19$ (35)	$2,32 \pm 0,32$ (58) $p=0,002$
	7	$0,97 \pm 0,16$ (34)	$1,85 \pm 0,36$ (48) $p=0,041$
	8	$0,84 \pm 0,17$ (27)	$2,80 \pm 0,49$ (70) $p=0,00075$
	12	$0,94 \pm 0,18$ (33)	$2,30 \pm 0,33$ (60) $p=0,00087$
	X	$1,85 \pm 0,35$ (54)	$2,00 \pm 0,37$ (61) $p>0,05$
	Y	$0,85 \pm 0,20$ (28)	$1,52 \pm 0,27$ (41) $p=0,034$
Отставание	2	$0,06 \pm 0,04$ (2)	$0,12 \pm 0,09$ (3) $p>0,05$
	7	$0,06 \pm 0,06$ (2)	$0,42 \pm 0,14$ (11) $p=0,0032$
	8	$0,06 \pm 0,04$ (2)	$0,08 \pm 0,06$ (2) $p>0,05$
	12	$0,09 \pm 0,06$ (3)	$0,42 \pm 0,24$ (11) $p>0,05$
	X	$1,10 \pm 0,20$ (18)	$0,67 \pm 0,21$ (35) $p>0,05$
	Y	$0,40 \pm 0,12$ (9)	$0,33 \pm 0,27$ (13) $p>0,05$
FISH с панцентромерными ДНК-зондами			
Центромеропозитивные микроядра	$2,72 \pm 0,30$ (120)	$3,90 \pm 0,47$ (156)	$p<0,05$
Центромеронегативные микроядра	$2,41 \pm 0,23$ (106)	$4,73 \pm 0,40$ (189)	$p<0,001$
Всего микроядер	$5,14 \pm 0,42$ (226)	$8,63 \pm 0,67$ (345)	$p<0,001$

Примечание. В скобках указано абсолютное число аномалий в группе.

для аутосом (в среднем 91,5 %) и от 63,5 до 82,0 % для половых хромосом (в среднем 72,2 %). Малые значения частоты отставания по каждой отдельной паре гомологов не позволяют провести статистически достоверный анализ хромосомного отставания. В связи с этим результаты FISH-анализа с использованием панцентромерных ДНК-зондов, позволяющих получить интегральную оценку уровня хромосомного отставания, представляют очевидный интерес (рисунок).

Действительно, в ходе проведенного исследования было показано,



Комбинации флуоресцентных сигналов, обнаруживаемые в двухъядерных лимфоцитах периферической крови человека с помощью FISH: а – нормальное распределение сигналов для хромосом 2 (красный) и 8 (зеленый); б – нерасхождение в одной клетке хромосом X (зеленый) и Y (красный); в – отставание целой хромосомы Y (красный) с образованием микроядра; г – двухъядерная клетка с двумя микроядрами: с одним и двумя флуоресцентными сигналами панцентромерных ДНК-зондов; д – двухъядерная клетка с микроядрами с различным количеством центромерных флуоресцентных сигналов; е – двухъядерная клетка с микроядром, содержащим более 4 центромерных флуоресцентных сигналов.

что частота центромеро-позитивных микроядер с одним или несколькими флуоресцентными сигналами панцентромерных ДНК-зондов (маркеры хроматидного или хромосомного отставания) значительно отличалась между группами: у работников СХК она составила 3,9 %, тогда как в контрольной выборке – 2,7 % ($p < 0,05$).

Что касается центромеро-негативных микроядер (маркеров кластогенного воздействия), то в группе работ-

опасных в генетическом отношении производств и населения территорий с техногенным загрязнением является актуальной задачей, требующей поиска новых биомаркеров воздействия ионизирующего излучения [3]. Применение современных молекулярно-цитогенетических методов, в сочетании со ставшим уже классическим в генотоксикологии микроядерным тестом на цитокинез-блокированных двухъядерных лимфоцитах перифе-

ников СХК их частота составила 4,7 % по сравнению с 2,4 % в контрольной группе ($p < 0,001$). Суммарная частота всех микроядер также значительно отличалась между группой работников СХК (8,6 %) и контрольной выборкой (5,1%) (табл. 2). Таким образом, наличие инкорпорированного плутония-239 в организме работников ядерно-химического производства приводит к значимому повышению частоты потерь хромосомных фрагментов, так и частоты отставания целых хроматид в процессе клеточного деления.

Заключение

Проведение мониторинга персонала потенциально

рической крови, позволяет с высокой чувствительностью определять величину и характер воздействия ионизирующего излучения на генетический аппарат соматических клеток человека. Следует подчеркнуть, что возможности использованного в настоящей работе подхода позволяют проводить оценку воздействия на человека не только ионизирующего излучения как вредного фактора производства, но и других потенциальных анеутогенов, влияние которых может быть связано как с профессиональной деятельностью, так и с проживанием на территориях с высоким уровнем техногенного загрязнения. За счет использования новых цитогенетических маркеров ионизирующего излучения становится возможным формирование групп высокого генетического риска, а также создание системы мониторинга и контроля над величиной воздействия, оказываемого на организм человека.

Литература

1. Назаренко С.А. Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешних факторов / С.А. Назаренко, В.А. Тимошевский // Генетика. – 2005. – Т. 41. № 1. – С. 1-5.
2. Тимошевский В.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий: анализ числовых хромосомных нарушений в интерфазных клетках человека (Наследственность и здоровье) / Под ред. В.П. Пузырёва / В.А. Тимошевский, И.Н. Лебедев, С.А. Назаренко. – Томск: «Печатная мануфактура», 2006. – 40 с.
3. Ядерно-химическое производство и генетическое здоровье / Назаренко С.А. [и др.]. – Томск: Печатная мануфактура, 2004. – 272 с.
4. Duesberg P. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells / P. Duesberg, A. Fabarius, R. Hehlmann // IUBMB Life. – 2004. – V. 56. – P. 65-81.
5. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay / M. Fenech // Nature Protocols. – 2007. – V. 2. – P. 1084-1104.
6. Garcia-Sagredo J.M. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology / J.M. Garcia-Sagredo // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – V. 1779. – P. 363-375.
7. Iarmarcovai G. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy / G. Iarmarcovai, A. Botta, T. Orsiere // Toxicology Letters. – 2006. – V. 166. – P. 1-10.
8. Sari-Minodier I. Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation / Sari-Minodier I. [et al.]. // Mutation Research. – 2007. – V. 629. – P. 111-121.