

УДК 612.112.94:575.224.23:614.876:57.087.1

ТРЕХЦВЕТНЫЙ FISH-МЕТОД: СРАВНЕНИЕ РЕТРОСПЕКТИВНЫХ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ДОЗОВЫХ ОЦЕНОК У РАЗНЫХ ПАЦИЕНТОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ ОСТРОМУ АВАРИЙНОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

© 2023 г. Е. Е. Ломоносова¹, В. Ю. Нугис^{1,*}, М. Г. Козлова¹, В. А. Никитина¹, И. А. Галстян¹, Г. П. Снигирева²

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*E-mail: nugisvju@list.ru

Поступила в редакцию 17.11.2022 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Представлены результаты использования трехцветного FISH-окрашивания хромосом (ДНК-пробы к 1, 4 и 12 парам хромосом) для цитогенетического исследования культур лимфоцитов периферической крови четырех пациентов в разные сроки после облучения в различных аварийных ситуациях. У всех пострадавших имелись первоначальные оценки доз: у одного по ЭПР-сигналу в эмали зуба (1.12 Гр) и у троих по частотам дицентриков (1.9; 3.2 и 4.3 Гр). Наблюдалась сильная существенная линейная корреляция между наблюдаемыми частотами транслокаций и исходными дозовыми оценками. Ретроспективная индикация дозы по частотам транслокаций осуществлялась с помощью собственной кривой доза–эффект, полученной на основании экспериментов с облучением крови здоровых доноров *in vitro*. В то же время оценки доз в отдаленные сроки у трех указанных больных с наибольшим поражением оказались существенно ниже, чем они были установлены ранее (1.26; 2.06 и 2.47 Гр). Только у оставшегося пациента наблюдалось совпадение исходного и повторного результатов.

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

DOI: 10.31857/S0869803123030104, **EDN:** XZNIIE

FISH-окрашивание хромосом культивируемых лимфоцитов периферической крови с помощью цельнохромосомных ДНК-зондов является современной методикой ретроспективной индикации полученных доз, причем возможно использование ее различных вариантов (от одноцветного до многоцветного). Как и при дозовых оценках, по частотам дицентриков в ближайшие сроки после острого облучения для этого необходимо иметь соответствующие кривые доза–эффект для транслокаций, полученные при облучении крови здоровых доноров *in vitro*. Этому была посвящена наша более ранняя работа с применением трехцветного FISH-метода [1]. На основании полученных зависимостей была произведена дозовая оценка у одного из пострадавших при аварии на Чернобыльской АЭС примерно через 25–35 лет после его радиационного поражения [2]. С помощью указанного цитогенетического подхода ретроспективное цитогенетическое исследование

было выполнено также еще у троих случайно облученных пациентов, у которых имелись исходные сведения о полученных дозах. Целью настоящего сообщения является сопоставление выходов транслокаций у этих четырех людей с первоначальными результатами индикации доз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для цитогенетических исследований служила взятая из кубитальной вены кровь четырех лиц, пострадавших в различных ситуациях от воздействия γ - или γ - β -излучения, которые кратко описаны ниже.

Пациент Ф.А.М. (1946 г. р.). 24.05.1968 г. он подвергся воздействию радиации в результате связанной с реактором аварией на атомной подводной лодке К-27, где он служил дозиметристом [3, 4]. В подобных случаях общей особенностью поражений являлся их сочетанный характер: по-

страдавшие одновременно подвергаются действию проникающего γ -излучения и слабо проникающему облучению покровов за счет внешнего β -излучения от радиационных газов и аэрозолей, прорвавшихся в отсеки, а также многократно рассеянного тормозного рентгеновского излучения. При этом обычно члены экипажа не полностью защищены от ингаляционного загрязнения радиоактивными изотопами йода и инкорпорации других радиоактивных продуктов деления [5]. У Ф.А.М. развилась ОЛБ, которой присвоили II степень тяжести. Дозиметрическая оценка была выполнена по ЭПР-сигналу в эмали зуба и составила 1.12 ± 0.05 Гр. Цитогенетическая оценка дозы не производилась. В отдаленные сроки у этого пациента были диагностированы гипертоническая болезнь (II степень), ишемическая болезнь сердца (стенокардия напряжения), хронический бронхит, пневмосклероз, атеросклероз сосудов головного мозга, сердца и нижних конечностей. Цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови пациента Ф.А.М. с использованием трехцветного FISH-окрашивания (ДНК зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом) было выполнено 29.05.2015 г., т.е. в возрасте 69 лет через 47 лет после радиационного воздействия.

Пациент Ф.А.И. (1967 г. р.) 15 августа 2000 г. в составе бригады из трех человек в качестве дефектоскописта участвовал в проведении планового контроля целостности швов газопровода при помощи гамма-дефектоскопа РИД 192/120М [6]. После окончания работ в результате неисправности собственно гамма-источник остался в направляющей головке. Во время работы она присоединяется к дефектоскопу, и в нее с помощью дистанционного устройства выдвигается из основного защитного корпуса дефектоскопа (радиационная головка) сам источник. В результате направляющая головка с источником была помещена в деревянный ящик в кузове автомашины, а работники, начиная с 19 ч 15.08.2000 г. до 01–02 ч 16.08.2000 г. перемещались около него с периодическим выходом на улицу, а затем легли спать в кузове. В 5–6 ч у всех появились тошнота и рвота, продолжавшиеся в течение 3 ч. Затем бригада в течение еще 3 ч возвращалась на базу, причем рвота в пути не прекращалась. Все случившееся было расценено как последствие использования некачественной пищи. 23.08.2000 г. бригада снова выехала на объект (три часа в пути), и при начале работы была обнаружена описанная неисправность. Дефектоскопист Ф.А.И. в нарушение всех правил руками переправил гамма-источник из направляющей головки в защитную головку дефектоскопа. Факт происшествия был скрыт от руководства, и только 4 сентября 2000 г. Ф.А.И. обратился к врачам по поводу лучевых ожогов кистей обеих рук. В итоге был поставлен следующий клинический диагноз: ОЛБ от общего (15–

16.08.2000 г.) и преимущественно локального (23.08.2000 г.) γ -облучения с развитием костномозгового синдрома легкой степени и местными лучевыми поражениями кистей рук тяжелой степени. При цитогенетическом исследовании культуры лимфоцитов периферической крови средняя оценка дозы на все тело по частоте дицентриков (классический метод) составила 1.9 Гр. По данным изучения ЭПР-сигнала эмали зуба доза равнялась 2.6 Гр. По физическим расчетам на все тело пришлось 1–3 Гр, на правую кисть – 30–50 Гр, на левую кисть – 40–70 Гр. С использованием трехцветного FISH-метода (ДНК зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом) цитогенетическое исследование культуры лимфоцитов Ф.А.И. было произведено 25.04.2016 г., т.е. примерно через 15 лет 8 мес. после радиационного инцидента, когда пациент достиг 49-летнего возраста.

Пациент Г.О.И. (1960 г. р.) пострадал при ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г. от преимущественно внешнего относительно равномерного γ - β -излучения, хотя имелись и местные лучевые поражения. Более подробно состояние больного описано в работе [2]. По данным цитогенетического анализа культуры лимфоцитов периферической крови в ближайшие сроки после облучения доза на все тело по средней частоте дицентриков соответствовала 3.2 Гр. Пациент неоднократно поступал в специализированную клинику, ныне относящуюся к ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, для повторных обследований с целью выявления отдаленных последствий радиационного поражения. При этом в общем временном промежутке 10 195–12 554 дней (27.9–34.4 лет) после облучения (в 54–60-летнем возрасте) производились неоднократные постановки культур лимфоцитов периферической крови для ретроспективного наблюдения за частотами хромосомных aberrаций, выявленных с использованием трехцветных ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом.

Пациент Д.Р.И. (1950 г. р.) также во время аварии на Чернобыльской АЭС подвергся воздействию относительно равномерного γ - β -излучения основной массы тела в дозе 4.3 Гр (оценена по средней частоте дицентриков в культуре лимфоцитов периферической крови). Через 30.1 и 30.5 лет после облучения (в 66–67-летнем возрасте) у него было осуществлено цитогенетическое исследование культур лимфоцитов периферической крови с помощью трехцветного FISH-окрашивания. Особенности данного случая (развитие острого миелобластного лейкоза) и проведенные цитогенетические исследования и их результаты подробно описаны ранее в статье [7]. Для данной работы были выбраны только результаты, полученные с использованием трехцветных ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом.

Таблица 1. Результаты цитогенетического трехцветного FISH-анализа (ДНК-пробы к 1, 4 и 12 парам хромосом) культур лимфоцитов периферической крови четырех пациентов в отдаленные сроки после перенесенного облучения при различных радиационных авариях

Table 1. The results of the cytogenetic three-color FISH analysis (DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes) of peripheral blood lymphocyte cultures of four patients in a distant period after an irradiation under various radiation accidents

Пациент	Первоначальная оценка дозы, Гр	Суммарное число проанализированных клеток	Частота FISH-регистрируемых aberrаций на 100 клеток						Ретроспективная оценка дозы по частоте транслокаций, Гр*	
			все транс-локации	инсерции	инверсии	дигентрики	центрические кольца	ацентрики	уравнение (1)	уравнение (2)
Ф.А.М.	1.12	580	4.48	0	0.52	0.34	0	0	1.12	1.09
Ф.А.И.	1.9	989	5.41	0	0.20	0.10	0	0	1.26	1.24
Г.О.И.	3.2	8446	12.51	0.19	0.11	0.18	0.02	0.32	2.06	2.05
Д.Р.И.	4.3	1366	17.24	0.22	0.15	0.81	0	1.32	2.47	2.45

Примечание. *В уравнении (1) фоновый уровень транслокаций предполагается не зависящим от возраста, тогда как в уравнении (2) возможна подстановка среднего значения фонового уровня транслокаций, характерного для людей рассматриваемого возраста (см. текст статьи).

Отметим еще раз, что, несмотря на наличие местных лучевых поражений, во всех трех случаях, когда была осуществлена первичная цитогенетическая оценка дозы, облучение основной массы лимфоцитов периферической крови было, по-видимому, относительно равномерным, так как распределения лимфоцитов по числу содержащихся в них дицентриков статистически значимо не отличались от распределения Пуассона, хотя имелись и определенные тенденции к отклонению в сторону повышенной дисперсии.

Методики постановки культур лимфоцитов периферической крови, приготовления препаратов хромосом, их FISH-окрашивания, критерии цитогенетического анализа с использованием системы “Метафер 4” (фирма “MetaSystems”, Германия) описаны в статьях [1, 7]. Отдельно отметим, что количества полных и неполных транслокаций были суммированы, а делеции не учитывались, так как анализу подвергались метафазы, в которых в наборах хромосом визуально отсутствовали утраты FISH-окрашенного материала.

Статистическую обработку данных (сравнение выборок по критерию χ^2 и регрессионный анализ) выполнили с использованием пакета программ Statistica 6. При уровнях значимости $p < 0.05$ различия считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты цитогенетических анализов в соответствии с трехцветным FISH-методом культур лимфоцитов периферической крови четырех пациентов, в отдаленные сроки

после радиационного воздействия. Как указывалось выше, во всех случаях использовались ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом. У пациентов Ф.А.М. и Ф.А.И. было проанализировано только по одной культуре лимфоцитов. У пациента Д.Р.И. временной разрыв между двумя цитогенетическими исследованиями составил около 150 дней [7]. Больше всего анализов (9) на протяжении примерно 6.5 лет было выполнено у пациента Г.О.И. [2]. В обоих случаях у каждого из обследованных лиц статистически значимые различия по цитогенетическим показателям в культурах лимфоцитов периферической крови, взятой в разное время, отсутствовали. Поэтому были созданы объединенные выборки полученных данных. В связи с тем, что у пациента Г.О.И. были обнаружены клоновые линии клеток, то для него осуществлялась коррекция на их наличие (считали, что каждый клон представлен только одной метафазой).

Отметим, что, как показано для пациентов Д.Р.И. и Г.О.И., во всех повторно поставленных в отдаленные сроки после облучения культурах частоты транслокаций существенно отличались от возрастных контрольных значений [2, 7]. То же самое было обнаружено и по отношению к пациентам Ф.А.М. и Ф.А.И. Соответственно, обнаруженные уровни транслокаций превышали спонтанные значения в 13 и 23.5 раза, и в обоих случаях уровень значимости был ниже 0.0001. При определении величины возрастного контроля исходили из данных, представленных в исследовании С.А. Whitehouse et al. [8].

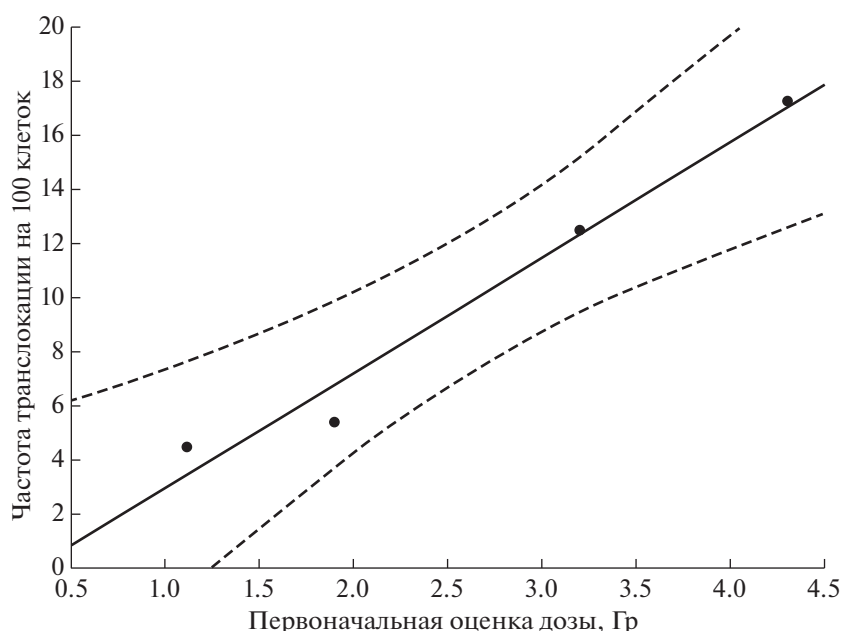


Рис. 1. Зависимость от первоначальной оценки дозы частоты транслокаций, выявленных с помощью трехцветного FISH-окрашивания для ДНК-проб к 1, 4 и 12 парам хромосом в отдаленные сроки после облучения (сплошная линия — линейная регрессия, пунктирные линии — границы 95%-ного доверительного интервала).

Fig. 1. The dependence on the initial dose estimate of translocation frequency detected using three-color FISH-painting for DNA-test to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes in a long time after irradiation (solid line — linear regression, dotted lines — borders of 95% confidence interval).

В статье [1] приведено следующее уравнение зависимости частоты транслокаций при использовании трехцветного FISH-окрашивания от дозы радиационного воздействия на лимфоциты периферической крови *in vitro*:

$$Y = (0.23 \pm 0.33) + (1.19 \pm 1.69) \times D + (2.31 \pm 0.24) \times D^2, \quad (1)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток, D — доза, Гр.

В таком виде данная дозовая зависимость не учитывает показанную в разных работах связь фонового уровня транслокаций с возрастом обследуемых лиц (см., например, [8]), так как постоянный член уравнения является фиксированным. Возраст же обследованных пациентов варьировал от 49 до 69 лет. Чтобы принять во внимание указанный фактор, был произведен перерасчет уравнения доза—эффект по данным работы [1] после вычитания наблюдавшегося контрольного уровня для каждого из доноров из обнаруженных частот транслокаций. Полученная зависимость представляла связь с дозой именно радиационно-индуцированных aberrаций хромосом и позволяла использовать различные фоновые частоты транслокаций:

$$Y = C + (1.363 \pm 0.457) \times D + (2.264 \pm 0.187) \times D^2, \quad (2)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток, D — доза, Гр, C — фоновая частота транслокаций, соответствующая возрасту обследованного лица.

Для расчета средних спонтанных предполагаемых уровней транслокаций были использованы сведения для геномных частот из работы [8], учитывая относительное содержание ДНК в 1, 4 и 12 парах хромосом. Были получены следующие значения частот на 100 клеток для возрастов 40–49, 50–59 и 60–69 лет: 0.215; 0.231 и 0.318 соответственно. Они и были подставлены в уравнение (2).

Ретроспективные оценки дозы, рассчитанные по уравнениям (1) и (2), приведены в предпоследнем и последнем столбцах табл. 1. Ясно видно, что различия между ними минимальны.

На рис. 1 показан график линейной зависимости наблюдаемых в отдаленные сроки после облучения частот транслокаций от первоначальных дозовых оценок у четырех обследованных пациентов (коэффициент корреляции $r = 0.986$ при уровне значимости $p = 0.014$):

$$Y = (-1.274 \pm 1.463) + (4.252 \pm 0.505) \times D,$$

где Y — частота FISH-транслокаций на 100 клеток, D — оценка дозы, Гр.

Также для математического описания тех же данных было получено следующее экспоненциальное уравнение:

$$Y = (2.861 \pm 0.672) \times \exp[(0.424 \pm 0.062) \times D]$$

при $r = 0.985$, $p = 0.026$, демонстрируя, что в принципе обе зависимости подходят для установления связи между частотами транслокаций и первоначальными оценками дозы.

График линейной регрессии зависимости между ретроспективными (по уравнению (2)) и первоначальными оценками доз ($r = 0.989$ при $p = 0.011$) представлен на рис. 2 вместе с прямой, демонстрирующей ситуацию их равенства:

$$D_T = (0.506 \pm 0.143) + (0.457 \pm 0.049) \times D_0,$$

где D_T — доза, оцененная по частоте FISH-транслокаций на 100 клеток, Гр; D_0 — первоначальная оценка дозы, Гр.

Из табл. 1 и рис. 1 видно, что только у пациента Ф.А.М. с наименьшей первоначальной оценкой дозы (1.12 Гр) наблюдается ее совпадение с ретроспективной оценкой по частотам FISH-окрашенных транслокаций. В остальных трех случаях (пациенты Ф.А.И., Г.О.И. и Д.Р.И.) с более высокими поглощенными дозами ретроспективные оценки были ниже установленных в ближайшие сроки после облучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, в настоящее время для цитогенетической ретроспективной индикации полученной дозы радиационного воздействия рекомендуется использовать различные варианты цельнохромосомного FISH-окрашивания для регистрации реципрокных транслокаций [9]. С научно-практической точки зрения наибольший интерес представляют случаи, когда эти исследования осуществляются у пострадавших, у которых имеется первоначальная достоверная физическая и/или биологическая индикация дозы. Последняя, с нашей точки зрения, может быть даже более важна в этой ситуации, поскольку более адекватна для сравнения с FISH-методом. Заметим, что измерение сигнала ЭПР-эмали зубов, с нашей точки зрения, также относится к системе биологической “дозиметрии” вследствие использования извлеченного из живого организма материала, несмотря на физический способ измерения изменений, произошедших в нем после радиационного воздействия. Действительно, в связи с индивидуальными особенностями в рамках этого подхода производится построение отдельной калибровочной дозовой зависимости для каждого случая (см., например, [10]).

Имеется обширный материал по ретроспективному изучению цитогенетических эффектов у лиц, пострадавших при атомной бомбардировке городов Хиросима и Нагасаки (см., например, [11]). Однако, несмотря на его безусловную объемность и важность, по объективным причинам отсутствовали выполненные в ближайшие сроки

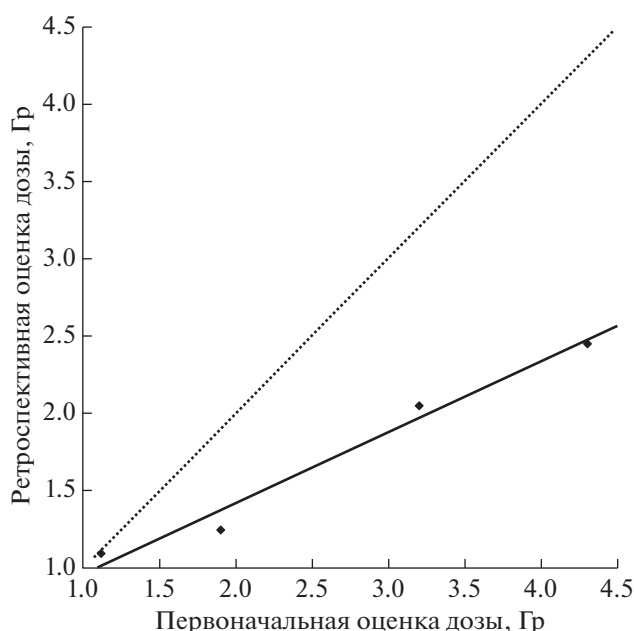


Рис. 2. Связь между первоначальной и ретроспективными оценками дозы (сплошная линия — линейная регрессия, пунктирные линии — границы 95%-ного доверительного интервала, точечная линия демонстрирует ситуацию, если бы обе дозовые оценки были равны).

Fig. 2. The relationship between the initial and retrospective dose estimates (solid line — linear regression, dotted lines — borders of 95% confidence interval, the point line demonstrates the situation if both dose estimates were equal).

после облучения исследования аберраций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови, а сведения об исходной дозовой нагрузке были основаны на физико-математических расчетах и определенных допущениях. Данное обстоятельство (в свете выше сказанного), с нашей точки зрения, не позволяет в полной мере использовать эти данные при обсуждении полученных нами результатов, особенно, при сопоставлении первичных и ретроспективных оценок дозы.

В настоящее время является общепризнанным, что, несмотря на первоначальную теоретическую задекларированность стабильности частоты транслокаций во времени, она снижается в определенные сроки после радиационного поражения (в дозах, вызывающих ОЛБ) вследствие совместного нахождения в лимфоцитах с нестабильными аберрациями хромосом, хотя и в не такой степени, как это происходит с последними [12]. Таким образом, интересным оказывается выявление закономерностей, по которым происходит уменьшение данного показателя.

Если рассматривать величины средних поглощенных доз, то у лиц, пострадавших при радиационных авариях на Чернобыльской АЭС (1986 г.)

[13, 14] и в г. Гойянии (Бразилия, 1987 г.) [15], через 6–8 и 10–13 лет не требовалась коррекция снижения частоты FISH-идентифицированных транслокаций после облучения в дозах до 2 и 1 Гр соответственно. Этот вывод был сделан на основе сравнения частот дицентриков (классическая окраска) сразу после воздействия и FISH-транслокаций в отдаленные сроки. Правда, по результатам цитогенетического обследования бразильских пациентов через 10 лет после инцидента авторы уменьшили этот порог до 0.5 Гр [16, 17], хотя с нашей точки зрения, указанный вывод не совсем обоснован. Независимо от этого у трех индивидуумов с первоначальной оценкой дозы по дицентрикам от 1.5 до 1.9 Гр ретроспективная оценка дозы по транслокациям варьировала от 0.4 до 1.0 Гр, снизившись, таким образом, приблизительно в 1.5–5 раз.

Также имеется сообщение о проведенных сравнительных цитогенетических исследованиях у одного пациента примерно через 1 год и 22 года после радиационного инцидента в 1997 г. в Учебном Центре Лило (Lilo Training Centre) недалеко от г. Тбилиси (Грузия) [18]. Во время первого обследования дозы по частотам дицентриков и FISH-транслокаций составили 0.58 (при 95%-ном доверительном интервале 0.33–0.87) Гр и 0.41 (0.12–0.88) Гр соответственно, а во время второго исследования при использовании FISH-окрашивания – 0.40 (0.08–0.87) Гр, демонстрируя независимую от времени практическую одинаковость дозовых оценок.

Изучение динамики частот радиационно-индуцированных FISH-регистрируемых транслокаций было осуществлено у трех пациентов, пострадавших в Эстонии в ноябре 1994 г. Длительность этого наблюдения составила 7 лет [19]. Было показано, что частота всех транслокаций во всех клетках (стабильных и нестабильных) достигала некоторой минимальной величины (примерно 70% от исходных значений) в течение первых двух лет. Это уровень составлял 52–57 транслокаций на 1000 клеток у двух пациентов с исходной оценкой дозы около 1 Гр, а у третьего больного со средней поглощенной дозой 2.7 Гр он был выше и равнялся примерно 78 на 1000 клеток. Таким образом, после начального снижения у отдельных пациентов количества транслокаций до некоторого плато сохранялась корреляция их частоты с дозой.

При групповом (в зависимости от степени тяжести ОЛБ) анализе динамики частот транслокаций у пациентов через 10–25 лет после облучения при аварии на Чернобыльской АЭС в качественном плане были получены аналогичные результаты [20]. На их основе было заключено, что в указанном временном промежутке (за исключением случаев с ОЛБ легкой степени) не наблюдалось

существенного снижения числа транслокаций, а время снижения от их начального до этого постоянного уровня оценивалось как 5–8 лет. Точно такая же неизменность геномной частоты транслокаций на протяжении 24.8–34.4 лет после радиационного воздействия была обнаружена для пациента Г.О.И. [21], что позволило объединить полученные цитогенетические данные для использования в настоящей статье.

Необходимо упомянуть также работу Liu Q.-J. et al. (2013) с сообщением о радиационном инциденте в городском округе Синьчжоу (Xinzhou, Китай) в конце ноября 1992 г., когда фермер утром подобрал источник ^{60}Co , положил его в карман куртки и принес домой (ситуация выглядит уже почти стандартной, если сравнить с происшествиями в Бразилии и Эстонии) [21]. У него возникли тошнота и рвота, и во второй половине дня он был госпитализирован, причем куртка с источником переместилась с ним в больницу. Через несколько дней последовала смерть пострадавшего, но за это время были облучены еще 37 человек, включая навещавших его отца и старшего брата (умерли через неделю) и жену на 19-й неделе беременности, которая несколько дней ухаживала за мужем. Полученная ею доза, судя по частоте дицентриков + колец в культуре лимфоцитов периферической крови на 41-е сутки после инцидента, составила 2.3 (95%-ный доверительный интервал 2.07–2.50) Гр. Дозу на матку оценили как 1.4 Гр. Ультразвуковое исследование на 36-й неделе гестационного периода продемонстрировало внутриутробную задержку роста плода. На 37-й неделе роды были искусственно стимулированы. В дальнейшем (до 16 лет) у ребенка отмечались несколько уменьшенная окружность головы, частые простуды и умеренная ментальная задержка. FISH-исследование у матери было осуществлено через 7.5 и 16 лет, а у дочери – через 16 лет после облучения. Соответственно были получены следующие оценки дозы по частоте транслокаций: у матери – 1.15 (0.78–1.44) и 0.76 (0.59–0.92) Гр, а у дочери 0.60 (0.35–0.78) Гр. Основываясь на оценках дозы у матери в ближайшие сроки после происшествия и через 16 лет, дозу, полученную плодом, после учета корректирующего фактора, рассчитали как 1.82 (1.35–2.54) Гр. Хотя в данном случае частота FISH-исследований была крайне небольшой, но очевидно снижение частот транслокаций и оцениваемых по ним доз с течением времени после радиационного воздействия в больших дозах, вызывающих ОЛБ.

Поскольку цитогенетические исследования с помощью трехцветного FISH-окрашивания хромосом лимфоцитов периферической крови у четырех представленных в настоящей статье пациентов были выполнены в общем диапазоне от 15 лет 8 мес. до 47 лет, то в свете представленных

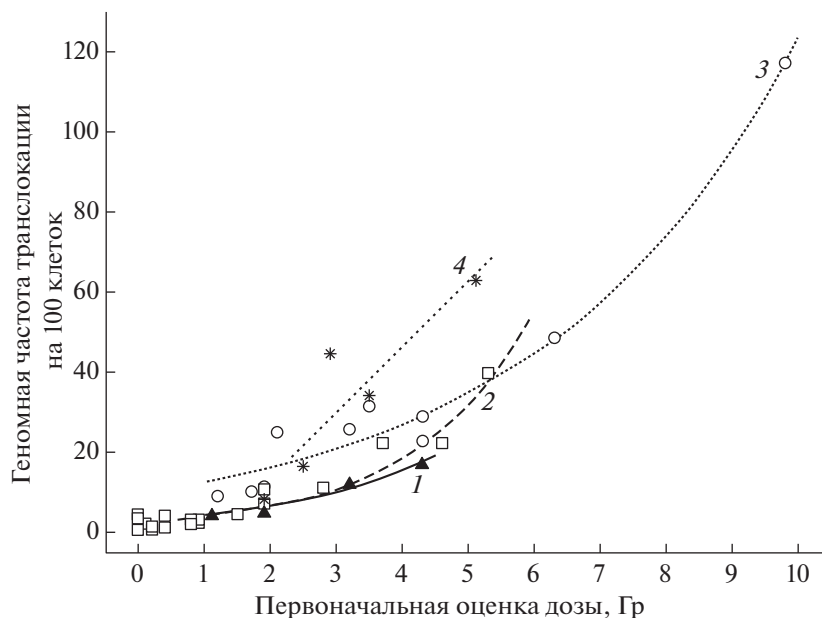


Рис. 3. Геномные частоты FISH-транслокаций и их зависимости от первоначальных оценок дозы в отдаленные сроки после радиационного воздействия, полученные из работ разных авторов: 1 — настоящая статья (закрашенные треугольники, сплошная линия); 2 — [15] (квадраты, пунктирная линия); 3 — [14] (круги, линия из частых точек); 4 — [23] (звездочки, линия из редких точек).

Fig. 3. Genomic frequencies of FISH-translocations and their dependence on the initial dose estimates in a distant dose after radiation exposure given in the works of various authors: 1 — this article (painted triangles, continuous line); 2 — [15] (squares, dashed line); 3 — [14] (circles, line from frequent points); 4 — [23] (stars, line from rare points).

выше данных из научной литературы есть все основания считать, что к моменту исследования частоты транслокаций у них уже стабилизировались и достигли определенного плато для каждого на своем уровне. Таким образом, построенные зависимости частот транслокаций и ретроспективных оценок дозы от первоначальных оценок дозы отражают реальную действительность и, по-видимому, предположительно они уже не будут изменяться с течением времени.

Практический интерес представляет сопоставление с первоначальными дозовыми оценками частот транслокаций, наблюдаемых в работах разных авторов в отдаленные сроки после облучения. На рис. 3 приведены соответствующие данные, почерпнутые из нашей работы и статей A.V. Sevan'kaev et al. (2005), A.T. Natarajan et al. (1998) и Y. Chen et al. (2009), посвященных пациентам, облученным в результате радиационных инцидентов на Чернобыльской АЭС, в г. Гойянии (Бразилии) и в г. Шанхае (Китай) [14, 15, 22]. Последняя авария произошла 25 июня 1990 г. в результате нарушений правил работы с γ -источником ^{60}Co с поражением в виде острого внешнего воздействия при высокой мощности дозы. Сроки проведения цитогенетических FISH-анализов пострадавших с Чернобыльской АЭС и из г. Гойянии указаны выше, а больные из г. Шанхая были обследованы через 12 лет после происше-

ствия. Некоторый парадокс состоит в том, что первичная оценка дозы в шанхайской группе была произведена по кривым доза—эффект, построенным по результатам воздействия γ -квантов ^{137}Cs на периферическую кровь *in vitro* [22, 23], в то время как в остальных сообщениях для этой цели использовались дозовые зависимости для γ -источника ^{60}Co [14, 24]. При этом источником γ -поражения в г. Гойянии служил изотоп ^{137}Cs [24]. На Чернобыльской АЭС произошел выброс изотопов $^{134,137}\text{Cs}$, а не ^{60}Co [25]. Однако эти обстоятельства, по-видимому, не имеют существенного значения, так как соответствующие калибровочные кривые для ^{137}Cs и ^{60}Co очень схожи [26].

В графическом виде связь между геномными частотами транслокаций и первоначальными дозовыми оценками представлена в виде экспоненциальных зависимостей для данных, полученных в настоящем исследовании (кривая 1) и работах [15] (кривая 2, чернобыльцы) и [14] (кривая 3, г. Гойяния), и как линейная зависимость для данных из статьи [22] (линия 4, г. Шанхай). Если оценивать этот рисунок чисто визуально, то кривые 1 и 2 практически совпадают. Кривая 3 располагается несколько выше для доз меньше 5 Гр. Наиболее выбиваются из общего ряда результаты статьи [22], в которой имеются, по крайней мере, две точки, демонстрирующие значительно увеличенную геномную частоту FISH-регистрируемых

транслокаций при формально схожих с другими исследованиями первоначальных оценках дозы.

Обнаруженные несоответствия могут быть обусловлены возникновением дополнительной неопределенности при переходе к геномным величинам в случаях использования разных наборов ДНК-проб, т.е. численному увеличению первоначально небольших различий между регистрируемыми частотами транслокаций [9]. Так, при цитогенетическом анализе в отдаленные сроки после облучения в г. Гойянии были применены 15 разных коктейлей ДНК-зондов, которые не включали только пробы к 5, 14 и Y хромосомам. Во время обследования шанхайской группы использовали ДНК-зонды только к 1 паре хромосом. Для FISH-анализа в нашем исследовании и у чернобыльских пациентов в работе [15] выбрали {1, 4 и 12} и {2, 3 и 8} пары хромосом соответственно. Правда, относительное содержание ДНК в этих группах хромосом примерно одинаково: 19.17 и 19.66% по отношению ко всему мужскому кариотипу [9].

Также весьма вероятно, что в отдельных лабораториях могут наблюдаться технические различия при проведении анализа FISH-окрашенных хромосом, что требует осуществления работ по стандартизации данного типа исследований.

ВЫВОДЫ

1. Между ретроспективными оценками дозы, оцененными по частотам FISH-регистрируемых транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови людей, и первоначальными оценками дозы по частотам дицентриков или сигналам ЭПР в эмали зуба наблюдается сильная корреляция.

2. Требуется коррекция величин ретроспективной цитогенетической оценки дозы при FISH-окрашивании хромосом после исходного облучения в дозах больше 1.1 Гр, для чего (в первом приближении) можно использовать полученную линейную зависимость.

3. Использование или неиспользование возрастной зависимости для спонтанной частоты FISH-регистрируемых транслокаций не играет никакой существенной роли при ретроспективной оценке доз выше 1 Гр.

4. В работах отдельных авторов наблюдаются различия между наблюдаемыми связями регистрируемых FISH-транслокаций с первоначальными дозовыми оценками, что, по-видимому, требует большей стандартизации методов FISH-анализа транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нугис В.Ю., Снигирёва 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. Т. 65. № 5. С. 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* // Med. Radiology and Radiat. Safety. 2020. V. 65. № 5. P. 12–20. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20>
2. Ломоносова Е.Е., Нугис В.Ю., Снигирёва 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. Т. 62. № 1. С. 5–17. [Lomonosova E.E., Nugis V.Yu., Snigiryova G.P. et al. Cytogenetic 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. V. 62. № 1. P. 5–17. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0869803122010064>
3. Метляева Н.А. Влияние личности на трудовую успешность, здоровье и социальную адаптацию двух участников аварии на атомной подводной лодке К-27, по данным психофизиологического обследования // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2009. Т. 54. № 4. С. 38–41. [Metljaeva N.A. Influence of the person on labour success, health and social adaptation of two participants of failure on nuclear submarine K-27 according to psychophysiological inspections // Med. Radiology and Radiat. Safety. 2009. V. 54. № 4. P. 38–41. (In Russ.)]
4. Метляева Н.А., Щербатых О.В. Особенности социальной адаптации участников, пострадавших в результате аварии на атомных подводных лодках К-19 и К-27, по данным психофизиологического обследования // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2016. Т. 61. № 1. С. 29–33. [Metljaeva N.A., Scherbatich O.V. Features of social adaptation of participants of the accident on the nuclear submarines K-19 and K-27 according to psychophysiological inspection // Med. Radiology and Radiat. Safety. 2016. V. 61. № 1. P. 29–33. (In Russ.)]
5. Гогин Е.Е., Емельяненко В.М., Бенецкий Б.А., Филатов В.Н. Сочетанные радиационные поражения. М.: Известия, 2000. 240 с. [Gogin E.E., Emelyanenko V.M., Beneckiy B.A., Filatov V.N. Associated radiation damages. Moscow: Izvestia, 2000. 240 p. (In Russ.)].
6. Колганов А.В., Филин С.В., Баранов А.Е. и др. Три случая острого радиационного поражения человека от гамма-источника (иридий-192): реконструкция дозы и клиническая картина // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2002. Т. 47. № 2. С. 34–45. [Kolganov A.V., Filin S.V., Baranov A.E. et al. Three cases of acute human radiation damage inflicted by gamma source (iridium-192): dose reconstruction and clinical picture // Med. Radiology and Radiat. Safety. 2002. V. 47. № 2. P. 34–45. (In Russ.)]

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. Т. 62. № 2. С. 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. V. 62. № 2. P. 90–95. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/0234-5730/2017-62-2-90-95>
8. Whitehouse C.A., Edwards A.A., Tawn E.J. et al. Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations // Int. J. Radiat. Biol. 2005. V. 81. № 2. P. 139–145. <https://doi.org/10.1080/09553000500103082>
9. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
10. Жумадилов К.Ш., Иванников А.И., Степаненко В.Ф. и др. ЭПР-дозиметрия населения, проживающего вблизи радиоактивного следа после ядерного испытания 29 августа 1949 г. на Семипалатинском испытательном полигоне // Радиация и риск. 2017. Т. 26. № 4. С. 55–60. [Zhumadilov K.Sh., Ivannikov A.I., Stepanenko V.F. et al. EPR dosimetry among the population living in proximity to radioactive trace after the nuclear test on 29 August, 1949 at the Semipalatinsk nuclear test site // Radiation and Risk. 2017. V. 26. № 4. P. 55–60. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2017-26-4-74-83>
11. Awa A. Mutation Research at ABCC/RERF: cytogenetic studies of atomic bomb exposed population // Mutat. Res. 2003. V. 543. № 1–2. P. 1–15. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(02\)00071-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(02)00071-6)
12. Tucker J.D. Reflections on the development and application of FISH whole chromosome painting // Mutat. Res. / Reviews in Mutation Research. 2015. V. 763. Complete. P. 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.006>
13. Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Mikhailova G.F. et al. Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure // Appl. Radiat. Isotop. 2000. V. 52. № 5. P. 1149–1152. [https://doi.org/10.1016/s0969-8043\(00\)00062-2](https://doi.org/10.1016/s0969-8043(00)00062-2)
14. Sevan'kaev A.V., Lloyd D.C., Edwards A.A. et al. A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident // Radiat. Prot. Dosim. 2005. V. 113. № 2. P. 152–161. <https://doi.org/10.1093/rpd/nch435>
15. Natarajan A.T., Santos S.J., Darroudi F. et al. ¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization: Eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims // Mutat. Res. 1998. V. 400. № 1. P. 299–312. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(98\)00021-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00021-9)
16. Camparoto M.L., Ramalho A.T., Natarajan A.T. et al. Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure // Mutat. Res. / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2003. V. 530. № 1–2. P. 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00132-5)
17. Sakamoto-Hojo E.T. Lessons from the accident with ¹³⁷Cesium in Goiania, Brazil: Contributions to biological dosimetry in case of human exposure to ionizing radiation // Mutat. Res. / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2018. V. 836. Part A. P. 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.019>
18. Guerrero J.M., Dugue D., Fernandez P. et al. Twenty-two years later: Consistent dose estimation of an accidental overexposure by retrospective biological dosimetry // EPR BioDose 2022, EPR BioDose, Mar 2022, Okayama, Japan, 2022. hal-03665556. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03665556>. Submitted on 11 May 2022.
19. Lingholm C., Edwards A. Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident // Int. J. Radiat. Biol. 2004. V. 80. № 8. P. 559–566. <https://doi.org/10.1080/09553000412331283498>
20. Нугис В.Ю., Севан'каев А.В., Хвостунов И.К. и др. Результаты 25-летнего цитогенетического обследования лиц, подвергшихся облучению в различных дозах при аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 1. С. 81–90. [Nugis V.Yu., Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K. et al. The results of 25 years of cytogenetic investigation of survivors exposed to different doses of irradiation in the Chernobyl accident // Radiation Biology. Radioecology. 2011. V. 51. № 1. P. 81–90. (In Russ.)]
21. Liu Q.-J., Lu X., Zhao H. et al. Cytogenetic analysis in 16-year follow-up study of a mother and fetus exposed in a radiation accident in Xinzhou, China // Mutat. Res. / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2013. V. 755. № 1. P. 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.015>
22. Chen Y., Jin C.-Z., Zhang X.-Q. et al. Seventeen-year follow-up study on chromosomal aberrations in five victims accidentally exposed to several Gy of ⁶⁰Co γ-rays // Radiat. Environ. Biophys. 2009. V. 48. № 1. P. 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00411-008-0203-y>
23. Liu Q., Cao J., Wang Z.Q. et al. Dose estimation by chromosome aberration analysis and micronucleus assays in victims accidentally exposed to ⁶⁰Co radiation // Br. J. Radiol. 2009. V. 82. № 984. P. 1027–1032. <https://doi.org/10.1259/bjr/62484075>
24. Ramalho A.T., Nascimento A.Ch., Natarajan A.T. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident // Radiat. Prot. Dosim. 1988. V. 25. № 2. P. 97–100 (1988). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a080358>
25. Kashparov V.A., Lundin S.M., Zvarych S.I. et al. Territory contamination with the radionuclides representing the fuel component of Chernobyl fallout // Sci. Total Environ. 2003. V. 317. № 1–3. P. 105–119. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00336-X)
26. da Silva M.A., Lemes M., dos Santos O.R. Study of chromosome aberrations induced in human lymphocytes following irradiation with ⁶⁰Co and ¹³⁷Cs *in vitro*. Available at: www.ipen.br/biblioteca/cd/inac/1997/EN-AN/E01_335.PDF. Accessed October 30, 2022.

Three-Color FISH Method: A Comparison of Retrospective Cytogenetic Dose Estimations in Different Patients Undergoing Acute Emergency Irradiation

E. E. Lomonosova^a, V. Yu. Nugis^{a,#}, M. G. Kozlova^a, V. A. Nikitina^a,
I. A. Galstyan^a, and G. P. Snigiryova^b

^a*State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia*

^b*Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia*

[#]*E-mail: nugisvju@list.ru*

This work presents the results of the use of three-color FISH-staining of chromosomes (DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes) for the cytogenetic study of peripheral blood lymphocyte cultures of four patients at different times after irradiation in various emergency situations. All victims had initial dose estimations: one by EPR signal in the tooth enamel (1.12 Gy) and three by the dicentric frequencies (1.9; 3.2 and 4.3 Gy). There was a strong significant linear correlation between the observed translocation frequencies and the initial dose estimations. Retrospective indication of the dose by translocation frequencies was carried out with the help of own dose-effect curve, the obtained on the basis of experiments with the irradiation of blood of healthy donors in vitro. At the same time, dose estimates in the long terms after irradiation in three of these patients with the greatest lesion were significantly lower than they were established earlier (1.26; 2.06 and 2.47 Gy). The coincidence of the initial and repeated results was observed only in one remaining patient.

Keywords: peripheral blood lymphocyte cultures, acute irradiation, three-color FISH-method, translocations, retrospective dose estimation