

ДИБСЬКИЙ С.С.

Науковий Центр радіаційної медицини АМН України, Україна, 04050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: dssdssds@rambler.ru

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ FISH ДЛЯ ВЕРИФІКАЦІЇ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ У 180 ЛІКВІДАТОРІВ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

Починаючи з 1999 р., в лабораторії цитогенетики НЦРМ АМН України в рамках Українсько-Американського проекту “Лейкемія” вперше в Україні вивчались можливості методу флюоресцентної *in situ* гібридизації метафазних хромосом людини з ДНК-зондами до цільних хромосом (FISH WHP) для ретроспективної реконструкції доз опромінення у ліквідаторів Чорнобильської аварії [1 - Було підтверджено, що метод FISH WCP може бути успішно застосований у віддалені строки після опромінення людини для індикації радіаційної дії та групової біологічної дозиметрії в широкому діапазоні доз. В той же час, значна варіабільність спонтанної та радіаційно-індукованої частоти реципрокних транслокацій, а також специфіка цитогенетичного ефекту при дуже високих дозах опромінення (елімінація мультиаберантних клітин, що містять як стабільні, так і нестабільні аберації) суттєво обтяжують індивідуальну реконструкцію доз опромінення в діапазоні як малих, так і дуже великих доз. Тому на сьогоднішня реальним залишається використання FISH аналізу для встановлення та верифікації доз опромінення у людини в діапазоні доз ~ 30 - 200 сГр [1 - 3].

Оскільки одним із нових завдань проекту “Лейкемія” у його дозиметричній частині є вибір т.з. “високодозної” групи ліквідаторів з верифікованими індивідуальними дозами опромінення, нами за допомогою методу FISH проводилося цитогенетичне обстеження учасників ліквідації Чорнобильської аварії з офіційними дозами опромінення саме у вказаному діапазоні. Необхідність таких досліджень викликана некоректністю офіційних доз опромінення у частини ліквідаторів, на що, зокрема, вказують і раніше одержані нами результати біологічної дозиметрії у реконвалесцентів після гострої променевої хвороби, українських ліквідаторів та персоналу об’єкту “Укриття”, і результати, отримані за допомогою методу FISH міжнародною групою авторів при цитогенетичному обстеженні естонських ліквідаторів [4 - 8].

Матеріал і методика

Цитогенетичну верифікацію офіційних доз опромінення проводили у 180 ліквідаторів Чорнобильської аварії 1986 р. – 76-ти осіб з Державного реєстру України осіб, постраждалих від Чорнобильської катастрофи (ДРУ), 70 осіб - з реєстру Міністерства оборони України та 34 особи з діагнозом гостра променева хвороба (ГПХ). Згідно протоколу використання методу FISH у дозиметричному розділі проекту “Лейкемія”, всі цитогенетичні дослідження проводили “всліпу”, на зашифрованих препаратах. Значення офіційних доз опромінення одержали після закінчення цитогенетичного аналізу.

Для одержання препаратів метафазних хромосом цільну венозну гепаринизовану кров (2 мл) культивували за полумікрометодом (0,5 мл крові для однієї культури) без контролю клітинного циклу згідно із стандартним протоколом лабораторії цитогенетики НЦРМ [3].

Культуру лімфоцитів інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA) без ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, з фітогемагютиніном (PHA, Difco-P, USA), протягом 48 годин (останні 3 години - з колцемідом, Colcemid, Sigma, USA), при t 37,5°C. Після гіпотонічної обробки клітинного осаду 0.075 М розчином KCl проводили трьохкратну обробку його фіксатором (абсолютним етанолом та ледяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3:1). Фіксовані клітинні осади зберігали у морозильній камері при -20 ° С декілька місяців, до моменту приготування препаратів метафазних хромосом.

Препарати для FISH аналізу готували ~ за 7 суток до проведення флуоресцентної *in situ* гібридизації. Для гібридизації використовували набір безпосередньо мічених флуорохромом "Spectrum orange" ДНК-зондів до цілих хромосом # 1, 2 и 4 (Vysis, USA), які становлять ~22 % диплоїдного генома та дозволяють виявляти ~35 % всіх транслокацій. Обробку препаратів проводили, згідно протоколу фірми Vysis (США), успішно адаптованому для роботи в умовах України, який включає наступні стадії: специфічну предобробку препаратів, гібридизацію (24 години при температурі 37°C), промивку, контрфарбування хромосом флуоресцентним барвником DAPI-1 (4,6-діамідіно-2-феніліндол) в спеціальному розчині, який запобігає швидкому вицвітання препарату при мікроскопуванні в УФ-світлі.

Препарати аналізували під люмінесцентним мікроскопом Axioscope (Germany), який мав люмінісцентну 100-ваттну лампу (USHIO, Japan) та набір спеціальних фільтрів (DAPI/ORANGE dual pass filter set, Zeiss, Germany), що дають змогу окремо та одночасно візуалізувати обидва флуорохром, завдяки чому хромосоми-мішені, фарбовані Spectrum orange (painted), та контрфарбовані DAPI хромосоми (unpainted), мають різний колір (рожево-оранжевий та голубий, відповідно), який залежить від використаного фільтра. Панцентромірні зонди не вживали, оскільки при використанні флуорохрому DAPI структура хромосом та положення центроміри виявляються досить чітко.

Обміни частинами між "painted" та "unpainted" хромосомами призводили до виникнення двокольорових структур, які містили одну або декілька центромір - повних (реципрокних, сбалансованих, two-way) та неповних (one-way) транслокацій, інверсій, інсерцій, поліцентриків, складних обмінів (complex exchanges), які вважали маркерами радіаційного впливу. Двокольорові безцентромірні структури приймали за ацентрики.

Ідентифікацію та облік хромосомних аберацій проводили згідно з PAINT номенклатурою [9].

Від кожного обстеженого, як правило, аналізували ~1000 метафаз (по 500 метафаз кожним з цитогенетиків). Всього проаналізували 92059 метафаз, що еквівалентно 32221 клітинам. Загальну частоту транслокацій на геном розраховували за формулою J. Lucas [10]:

$$F_g = F_p / 2.05 f_p (1 - f_p), \text{ де}$$

F_g - частота транслокацій на геном;

F_p - виявлена частота транслокацій з участю "painted" хромосом;

f_p - доля генома, яку складають хромосоми-мішені (для використаного нами хромосомного коктейля - 22 %).

Для реконструкції поглинутої дози опромінення використовували частоту тільки реципрокних транслокацій, які вважали за одну подію. Враховуючи сценарій радіаційної дії на обстежену групу ліквідаторів, розрахунок дози радіації проводили за алгоритмом, розробленим J. Lucas для хронічного рівномірного гамма-опромінення Cs^{137} [11].

Результати та обговорення

Результати флуоресцентного цитогенетичного аналізу, згідно з якими було реконструйовано біологічні дози опромінення, показали що у 76-ти ліквідаторів з Державного реєстру індивідуальні офіційні дози опромінення коливались від 8 до 180 сГр, середньогрупова доза складала 64 сГр. Біологічні дози варіювали від 27 до 133 сГр, тобто за результатами FISH аналізу майже всю групу цивільних ліквідаторів можна вважати за "високодозну" із середньогруповою дозою 46 сГр. У 28-ти випадках індивідуальні офіційні та біологічні дози опромінення практично не відрізнялись; у 34-х випадках офіційні дози були вище за біологічні; у 14-ти офіційні дози були дещо нижче за FISH-дози.

Аналогічні данні (тільки при значно більш високих дозових навантаженнях) були виявлені в групі осіб з діагнозом ГПХ. Так, індивідуальні офіційні та біологічні дози опромінення коливались від 600 до 5500 та від 210 до 4040 мГр, відповідно,

завдяки чому аналогічні середньогрупові показники склали 2410 и 1460 мГр. У цій групі також переважали випадки с більш високими (у порівнянні з FISH дозиметрією) значеннями офіційних доз опромінення, які були виявлені у 24-х з 34-х обстежених. Тільки у 2-х осіб офіційні дози опромінення були нище за біологічні дози, у 8-ми осіб біологічні та офіційні дози практично не відрізнялись.

У групі ліквідаторів з реєстру Міністерства оборони індивідуальні офіційні дози опромінення коливались від 250 до 600 мГр, біологічні - від 160 до 630 мГр. Тільки у 8-ми випадках офіційні дози були дещо вище за біологічні. У 32-х ліквідаторів FISH-дози перевищували офіційні дози. У 30-ти осіб офіційні дози відповідали біологічним. За результатами FISH аналізу групу військових ліквідаторів також можна віднести до “високодозної” із середньогруповою біологічною дозою 390 мГр, що дещо перевищувало середню офіційну дозу (330 мГр).

Таким чином, за результатами роботи встановлено, що у цивільних ліквідаторів з ДРУ та осіб з діагнозом ГПХ домінували випадки з перевищенням індивідуальних офіційних доз опромінення над FISH-дозами, завдяки чому середньогрупова FISH доза була нижча за офіційну. В той же час, у осіб з реєстру Міністерства оборони переважали випадки з деякою недооцінкою індивідуальних офіційних доз в порівнянні з біологічними дозами опромінення, тому середньогрупова FISH доза була вища за офіційну. За середньогруповими значеннями біологічних доз опромінення можна вважати, що обидві групи, які можна віднести до “високодозних”, одержали майже ідентичне радіаційне навантаження (460 та 380 мГр, відповідно).

Висновки. За допомогою методу FISH проведено реконструкцію та верифікацію групових та індивідуальних доз опромінення у 180 осіб - цивільних та військових ліквідаторів Чорнобильської аварії а також осіб з діагнозом ГПХ. Результати молекулярно-цитогенетичного аналізу дозволили віднести майже всіх обстежених до т.з. “високодозної” групи з радіаційним навантаженням, що перевищувало дозволене для аварійної ситуації (250 мГр).

Література

1. *Pilinskaya M. A., Dibskiy S. S.* FISH versus EPR dosimetry in 49 Chernobyl liquidators. Доповіді НАН України.- 2001.- N 2.- С. 185-189.
2. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* Частота стабильных хромосомных aberrаций, установленная с помощью метода FISH у 49 ликвидаторов Чернобыльской аварии с различными дозами облучения // Цитология и генетика, 2002.- том 35 .- № 4 , С. 50 - 54.
3. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Скалецкий Ю.Н и др.* Опыт использования метода FISH для реконструкции индивидуальных доз облучения у ликвидаторов Чернобыльской аварии в рамках Украинско-Американского проекта «Лейкемия». Цитология и генетика. – 2006.- том 40, N 3.- С.34-39.
4. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Халявка И.Г.* Использование метода FISH для обследования лиц, перенесших острую лучевую болезнь в связи с аварией на Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика.- 1998.- том 32, № 1.- С. 22-31.
5. *Pilinskaya M.A. , Dybskiy S.S.* On the frequency of chromosome exchanges in some highly irradiated groups of Chernobyl accident victims measured by conventional chromosome analysis and whole chromosome painting // Доповіді НАН України.- 1999.- № 7.- С. 169-173.
6. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* Частота хромосомных обменов в критических группах жертв Чернобыльской аварии по данным традиционного цитогенетического анализа и метода FISH. Международный журнал радиационной медицины.- 2000. - № 1 (5).- С. 83-95.
7. *Littlefield L.G., McFee A. F., Salomaa S. I. et al.* Do recorded doses overestimate true doses received by Chernobyl cleanup workers? Result of cytogenetic analyses of Estonian workers by fluorescence in situ hybridization // Radiation Reserch., 1998.- vol.150.- P.237-249.

8. Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A. et al. A proposed system for scoring structural aberrations detecting by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995.-vol. 68.- P. 211-221,
9. Lucas J.N., Awa A., Straume. T. et al. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation.// *Int. J. Radiat. Biol.*- 1992.- vol. 62, N 1.P. 53-63.
10. Lucas J., Hill F., Burk C. et al. Dose-response curve for chromosome translocations induced by low-dose rate 137-Cs gamma rays // *Rad. Prot. Dosimetry.*- 1995.- vol.68.- P.761-765.

Резюме

За допомогою методу FISH проведено верифікацію офіційних доз опромінення у 180-ти ліквідаторів Чорнобильської аварії. Встановлено, що середньогрупові біологічні дози опромінення у цивільних ліквідаторів та реконвалесцентів гострої променевої хвороби були дещо нижчими за офіційні внаслідок домінування випадків переоцінки індивідуальних офіційних доз. У військових ліквідаторів встановлена протилежна тенденція.

С помощью метода FISH проведена цитогенетическая верификация официальных доз облучения у 180-ти ликвидаторов Чернобыльской аварии. Показано, что среднегрупповые биологические дозы облучения у гражданских ликвидаторов и реконвалесцентов острой лучевой болезни были несколько ниже официальных из-за преобладания случаев переоценки индивидуальных официальных доз. У военных ликвидаторов установлена противоположная тенденция.

With the help of FISH technique cytogenetical verification of the Official Dose Records (ODR) in 180 liquidators of Chernobyl accident had been fulfilled. In the civil liquidators and patients recovered from acute radiation sickness the cases with overestimated individual ODR had been predominated as well as in the liquidators from Military Register the cases with underestimation of ODR in comparison with biological radiation doses had been prevailed.

ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»

Україна, 79000, м. Львів, вул.М.Лисенка, 31а, e-mail:root@ihp.lviv.ua

ІМУНОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ У ЖІНОК ІЗ СХИЛЬНІСТЮ ДО УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ

Причини репродуктивних втрат у людини – різноманітні і до кінця не з'ясовані, серед яких найбільш загадковою є «поведінка» імунітету. Більше того, цілий ряд авторів взагалі вважають, що втрата плоду, особливо на ранніх термінах вагітності, має переважно імунну етіологію [1- 5].

Останнім часом при вивченні причин невиношування вагітності особливу увагу дослідників привертає наявність в організмі інфекцій, що передаються статевим шляхом, так звані інфекції TORCH-комплексу. Особливістю такого роду інфекцій є те, що в більшості випадків вони протікають безсимптомно, для них характерний рецидивуючий перебіг хвороби та відсутність стійкого імунітету, а тривала персистенція їх в організмі веде до розвитку вторинних імунodefіцитів та автоімунних порушень[6-10].

З іншого боку, у багатьох публікаціях [2,5,8,9] передбачається, що активізація персистентних інфекцій у вагітних обумовлена посиленням загальної та локальної супресивної активності, направленої на становлення та підтримку імунної