

М.А. ПИЛИНСКАЯ, С.С. ДЫБСКИЙ,
Ю.Н. СКАЛЕЦКИЙ, В.В. ЧУМАК, И.С. ДЯГИЛЬ,
Т.Ф. ЛЮБАРЕЦ, А.Е. РОМАНЕНКО,
В.Г. БЕБЕШКО, Д.А. БАЗЫКА

Научный Центр радиационной медицины АМН Украины, Украина
04050, Киев, ул. Мельникова, 53,
e-mail: pww@ukr.net

**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА
FISH ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ
ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДОЗ
ОБЛУЧЕНИЯ У ЛИКВИДАТОРОВ
ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АВАРИИ
В РАМКАХ УКРАИНСКО-
АМЕРИКАНСКОГО ПРОЕКТА
«ЛЕЙКЕМИЯ»**



Обобщены и проанализированы результаты собственных исследований, полученные при цитогенетическом обследовании 225 человек с помощью метода FISH: группы сравнения, ликвидаторы Чернобыльской аварии с различными дозами облучения, онкогематологические пациенты. Сделаны выводы в отношении возможностей и ограничений использования метода FISH для ретроспективной биодозиметрии радиационного воздействия на человека.

© М.А. ПИЛИНСКАЯ, С.С. ДЫБСКИЙ, Ю.Н. СКАЛЕЦКИЙ,
В.В. ЧУМАК, И.С. ДЯГИЛЬ, Т.Ф. ЛЮБАРЕЦ,
А.Е. РОМАНЕНКО, В.Г. БЕБЕШКО, Д.А. БАЗЫКА, 2006

Введение. Важной составной частью Международного проекта «Украинско-Американское исследование лейкемии и родственных гематологических заболеваний у ликвидаторов Чернобыльской аварии» («Studies of Leukemia and Related Hematological Disorders in the Ukrainian-US Study of Cleanup Workers following the Chornobyl Accident») являются дозиметрические исследования, поскольку для доказательства возможности возникновения радиационно-индуцированных онкогематологических заболеваний как одного из серьезнейших возможных медицинских последствий Чернобыльской аварии и тем более для оценки дозозависимого увеличения риска лейкемии среди ликвидаторов по сравнению с контрольной популяцией необходимо иметь данные о величине индивидуальных доз облучения у пациентов с гемобластомами.

В настоящее время не существует универсального метода для ретроспективного восстановления индивидуальных доз радиационного воздействия на человека, а каждый из используемых современных методов дозиметрии (RADRUE, ЭПП-спектрометрия эмали зубов, FISH-WCP) имеет свои достоинства и недостатки, которые определяют как возможность их применения при проведении широкомасштабных эпидемиологических исследований, так и достоверность величин восстановленных доз облучения.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация метафазных хромосом человека (FISH) с ДНК-зондами к целым хромосомам (whole chromosome painting — WCP) — один из так называемых лабораторных или инструментальных методов биологической дозиметрии, разработанный в 80-е годы прошлого столетия в Ливерморской Национальной лаборатории США и позволяющий обнаруживать в лимфоцитах периферической крови человека стабильные аберрации хромосомного типа, частота которых зависит от дозы облучения и почти не изменяется с течением времени [1].

Метод FISH-WCP достаточно широко используют в последнее десятилетие при обследовании лиц, подвергшихся аварийному облучению, не только для качественной индикации факта воздействия ионизирующей радиации на человека, но и для биологической дозиметрии (групповой и индивидуальной) в различные сроки после облучения [2–24]. В 1998 г.

метод FISH-WCP успешно апробировали в проекте «Украинско-Американское исследование лейкемии и родственных гематологических заболеваний у ликвидаторов Чернобыльской аварии» для реконструкции и верификации индивидуальных официальных доз облучения ликвидаторов Чернобыльской аварии.

Метод был освоен сотрудниками НЦРМ д.м.н. Пилинской М.А. и к.б.н. Дыбским С.С. на базе биомедицинского отдела Ливерморской Национальной лаборатории США (Dr. T. Straume, Dr. J. Lucas), а также лаборатории цитогенетики Оак-Риджской Национальной лаборатории США (Dr. G. Littlefield, Dr. A. Mc Fee) и впервые в Украине успешно внедрен в практику работы лаборатории цитогенетики НЦРМ, где был адаптирован к местным условиям. Для выполнения исследований в рамках проекта с помощью метода FISH лаборатория цитогенетики была оснащена необходимым оборудованием и обеспечена регулярной поставкой расходных материалов и реактивов.

Материал и методы. Методика получения, обработки и цитогенетического анализа флюоресцентных препаратов метафазных хромосом человека подробно описана в наших предыдущих публикациях [15, 16, 20, 21, 23, 25–28].

Для гибридизации использовали набор меченных флюорохромом «Spectrum Orange» ДНК-зондов к целым метафазным хромосомам 1, 2 и 4 («Vysis», США), которые составляют ≈22 % диплоидного генома и позволяют выявлять ≈35 % всех транслокаций. Препараты обрабатывали согласно протоколу фирмы «Vysis» (США), адаптированному для работы в условиях Украины. Идентификацию и учет хромосомных aberrаций проводили в соответствии с PAINT номенклатурой [29]. От каждого обследованного анализировали, как правило, не менее 1000 метафаз (по 500 метафаз каждым из двух исследователей с перекрестным контролем). Частоту реально выявленных транслокаций пересчитывали на геном-эквивалент по известной формуле Lucas [30]. Для реконструкции доз облучения использовали частоту только полных (реципрокных) транслокаций и инсерций, которые принимали за одно событие. Учитывая сценарий радиационного воздействия на обследованные группы ликвидаторов, расчет дозы облучения

проводили в соответствии с алгоритмом, разработанным Lucas [31] для хронического равномерного гамма-облучения ^{137}Cs .

Всего обследовали 225 человек: две группы мужчин, по 10 человек в каждой (средний возраст 23 и 53,5 лет соответственно), не подвергавшихся радиационному воздействию и отрицающих сознательный контакт с известными либо предполагаемыми мутагенами (региональные контрольные группы сравнения); 189 ликвидаторов из Государственного регистра Украины лиц, пострадавших от Чернобыльской катастрофы (ГРУ), и Регистра Министерства обороны Украины в возрасте 37–73 лет на момент обследования (диапазон официальных доз — от 100 до 2450 мГр); 5 ликвидаторов с различными онкогематологическими диагнозами (так называемые «случаи»); 11 пациентов (не ликвидаторов) с гемобластомами.

Согласно протоколу использования метода FISH в дозиметрическом разделе проекта «Лейкемия» все цитогенетические исследования проводили «вслепую» на зашифрованных препаратах; данные об официальных дозах облучения получали после окончания цитогенетического анализа.

Цитогенетическое обследование онкогематологических пациентов проводили до начала цитостатической терапии.

На разных этапах исследований решали следующие основные задачи: получение региональных контрольных данных в соответствующих возрастных группах сравнения; определение чувствительности метода FISH для групповой и индивидуальной биодозиметрии; верификация индивидуальных официальных доз облучения в так называемых «высокодозных» группах ликвидаторов, которые согласно официальным документам подверглись радиационному воздействию в дозах свыше 250 мГр; апробация метода FISH для молекулярно-цитогенетического обследования и оценки индивидуальных доз облучения у больных с онкогематологической патологией (живых пациентов-ликвидаторов); сравнение результатов индивидуальной дозиметрии, полученных с помощью методов FISH-WCP, RADRUE и ЭПР.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты обследования контрольной груп-

пы в целом отвечают основным закономерностям спонтанного хромосомного мутагенеза, установленным в лабораториях разных стран с помощью метода FISH и характерным для лиц в возрасте до и после 50 лет, в частности, значительное преобладание стабильных aberrаций хромосом над нестабильными, широкий диапазон межиндивидуальных колебаний спонтанной частоты стабильных aberrаций у лиц одного возраста (0,006—0,014 и 0,006—0,025 на клетку на геном-эквивалент соответственно), тренд к возрастанию уровня стабильных aberrаций с возрастом. Вместе с тем полученные нами среднегрупповые спонтанные уровни стабильных хромосомных aberrаций (0,009 + 0,001 и 0,013 + 0,002 на клетку на геном-эквивалент для лиц молодого и старшего возраста соответственно) несколько превышали среднепопуляционную возрастную норму, установленную для населения России, Западной Европы и США, что, вероятно, связано с действием каких-либо неидентифицированных «confounding» факторов [5, 6, 12, 14, 32]. Вместе с тем наши данные хорошо согласуются с результатами, полученными в Украине Мазник и др. [22] для 12 контрольных лиц (в возрасте от 19 до 58 лет), которые использовали идентичные нашим флюоресцентные зонды к тем же хромосомам — 1, 2 и 4.

Полученные нами результаты подтвердили литературные данные о том, что метод FISH-WCP может быть успешно использован в отдаленные сроки после облучения человека для индикации радиационного воздействия и групповой биологической дозиметрии в широком диапазоне доз. Вместе с тем значительная вариабельность спонтанной и радиационно-индуцированной частоты стабильных aberrаций (реципрокных транслокаций), а также специфика цитогенетического эффекта при очень высоких дозах облучения (появление так называемого «complex exchanges», элиминация мультиабберантных клеток, содержащих как стабильные, так и нестабильные aberrации) существенно отягощают индивидуальную реконструкцию доз облучения в диапазоне как малых (менее 200 мГр), так и очень больших (свыше 2000 мГр) доз. Поэтому в настоящее время реальным остается использование метода FISH для ретроспективной до-

зиметрии у контингентов приоритетного наблюдения в диапазоне доз ≈200—2000 мГр, в пределах воздействия которых у ликвидаторов может происходить инициация либо реализация онкогематологической патологии. Чувствительность метода FISH для индивидуальной дозиметрии может быть повышена при увеличении выборки анализируемых клеток (нами, как и большинством исследователей, анализировалось, как правило, не менее 1000 метафаз на одного обследуемого). Для повышения точности дозовых оценок целесообразно также построить собственные кривые «доза—эффект» при облучении крови *in vitro* в диапазоне ожидаемых доз для уточнения коэффициентов перерасчета в используемой нами в настоящее время формуле Lucas [33].

Результаты цитогенетических обследований ликвидаторов Чернобыльской аварии, проведенных нами в течение 1999—2005 гг., показали, что в ряде случаев биологически эквивалентные FISH дозы существенно отличались (в сторону их завышения либо занижения) как от официальных доз, так и от доз, рассчитанных на основании другого инструментального метода биодозиметрии — ЭПР [20, 26]. У гражданских ликвидаторов из ГРУ доминировали случаи с превышением официальных доз облучения над FISH-дозами, благодаря чему среднегрупповая FISH-доза была ниже официальной (450 и 600 мГр соответственно) [17]. У ликвидаторов из регистра Министерства обороны, представленных в основном военными ликвидаторами начального этапа ликвидации последствий Чернобыльской аварии, преобладали случаи с некоторой недооценкой индивидуальных официальных доз в сравнении с биологическими дозами облучения, поэтому среднегрупповая FISH доза была выше официальной (430 и 340 мГр соответственно) [21]. Тем не менее по результатам FISH-дозиметрии почти всех обследованных ликвидаторов можно было отнести к так называемой «высокодозной» группе, которая получила радиационную нагрузку, превышающую разрешенную для аварийной радиационной ситуации (250 мГр). Среднегрупповые дозовые оценки, полученные как для гражданских, так и для военных ликвидаторов, подтвердили их участие в аварийных работах в ближайшие сроки после Чернобыльской аварии.

Что же касается расхождения между дозиметрическими данными, полученными с помощью методов ЭПР и FISH, не исключено, что FISH измерения отражают «экранированный» тип облучения и зависят как от геометрии облучения, так и от использования средств индивидуальной противорадиационной защиты, а данные ЭПР соответствуют «неэкранированному» облучению, в силу чего обе оценки и могут существенно отличаться. Вместе с тем методы FISH и ЭПР могут быть использованы в качестве опорной точки сравнения для нового расчетного метода RADRUE, который был принят в проекте «Лейкемия» как базовый для расчета индивидуальных доз облучения, полученных ликвидаторами. В настоящее время проводится сравнение результатов дозиметрии, полученных с помощью методов RADRUE, FISH и ЭПР, и анализируются возможные причины их различий.

У больных (не ликвидаторов) с гемобластомами наблюдали почти идентичный цитогенетический эффект по общему количеству хромосомных aberrаций и в особенности по частоте полных транслокаций, который не зависел от диагноза (острый миелобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз) и незначительно превышал спонтанный уровень, возможно, за счет некоторой дестабилизации генома вследствие онкогематологической патологии [34]. Исключением был один случай — пациентка с диагнозом хронического миелоидного лейкоза, проживающая в г. Желтые Воды с неблагоприятной экологической ситуацией (добыча урана). Не исключено, что эта пациентка могла подвергнуться неконтролируемому радиационному воздействию, доза которого по результатам FISH-анализа в среднем составляла 390—410 мГр (в случаях острого либо хронического облучения соответственно). Полученные результаты подтвердили данные Домрачевой [34] о том, что частота стабильных хромосомных aberrаций у больных лейкозами (за исключением специфических клоновых) обуславливается не столько характером заболевания, сколько радиационным воздействием, что делает возможным использовать метод FISH для ретроспективной дозиметрии у ликвидаторов с гемобластомами.

У больных ликвидаторов с онкогематологической патологией частота реципрокных транслокаций во всех случаях достоверно превышала аналогичный показатель в предыдущей (контрольной) группе и в четырех случаях соответствовала дозе облучения 310—400 мГр, а в одном случае достигала 2120—2240 мГр. При сравнении индивидуальных доз облучения, реконструированных в этой группе с помощью методов RADRUE и FISH, оказалось, что величины доз, восстановленных с помощью этих методов, существенно различались. В упомянутом случае с максимальной дозой облучения высокий цитогенетический эффект был обусловлен предыдущей лучевой терапией, что и обнаружено с помощью FISH-анализа.

Следует отметить, что по своей природе метод RADRUE позволяет определять только дозы, полученные за период пребывания в 30-км зоне и не учитывает профессионального или медицинского (диагностического либо терапевтического) облучения. В то же время FISH и ЭПР регистрируют кумулятивные дозы от всех источников, полученные индивидуумом на протяжении всей жизни (или, в случае ЭПР, с момента формирования постоянного зуба).

Причины расхождений результатов двух указанных методов дозиметрии, а также ЭПР vs FISH и ЭПР vs RADRUE требуют углубленного изучения и анализа, что и является предметом дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность Национальному институту рака США и Департаменту энергетики США за поддержку и частичное финансирование настоящей работы (проект «Украинско-Американское исследование лейкемии и родственных гематологических заболеваний у ликвидаторов Чернобыльской аварии»).

SUMMARY. The results of proper investigations received under the cytogenetic examination of 225 persons (control groups, Chernobyl liquidators exposed to different radiation doses, oncogematology patients) had been summarized and analyzed. The conclusion concerning possibilities and limitations of FISH technique usage for retrospective biodosimetry of human radiation exposure has been presented.

РЕЗЮМЕ. Узагальнено та проаналізовано результати власних досліджень, отримані при цитогенетичному обстеженні 225 осіб за допомогою методу FISH: групи порівняння, ліквідатори Чорнобильської аварії з різними дозами опромінення, онкогематологічні хворі. Зроблено висновки щодо можливостей та обмежень використання методу FISH для ретроспективної біодозиметрії опромінення людини.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Edwards A.A.* Fluorescence in situ hybridisation (FISH) // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 5–6.
2. *Bothwell A.M., Whitehouse C.A., Tawn E.J.* The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 7–14.
3. *Darroudi F., Natarajan A.T.* Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: state of art and current views // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 51–58.
4. *Darroudi F.* Use of FISH translocation analysis for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations? // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 101–109.
5. *Knehr S., Bauchinger M.* Application of FISH painting for dose reconstruction: current status and views of GSF cytogenetics group // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 15–20.
6. *Lindholm C., Salomaa S.* Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting // *Radiat. Protect. Dosimetry.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 21–26.
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 // *Radiat. Res.*, 1998. — **150**. — P. 237–249.
8. *Littlefield L.G., McFee A.F., Sayer A.M. et al.* Induction and persistence of chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to neutrons in vitro or in vivo: implications of findings in «retrospective» biological dosimetry // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 59–68.
9. *Lucas J.N., Deng W.* Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 77–86.
10. *Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C., Hone P.* The use of FISH chromosome painting for assessment of old doses of ionising radiation // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 27–34.
11. *Press S., Romm H., Ganguly B.B., Stephan G.* Experience with FISH-detected translocations as an indicator in retrospective dose reconstruction // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 45–50.
12. *Sorokine-Durm I., Durand D., Delbos M. et al.* French view on FISH painting as a biodosimeter // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 35–44.
13. *Tucker J.D.* Evaluation of chromosome translocations by FISH for radiation biodosimetry: a view from one laboratory // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — **88**, № 1. — P. 87–92.
14. *Воробцова И.Е., Такер Дж.Д., Тимофеева Н.М. и др.* Влияние возраста и облучения на частоту транслокаций и дисцентриков, определяемых методом FISH в лимфоцитах человека // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 2000. — **40**, № 2. — С. 142–148.
15. *Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Mikhailova G.F. et al.* Novel data for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure // *Appl. Radiat. and Isotop.* — 2000. — № 52. — P. 1149–1152.
16. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* Частота хромосомных обменов в критических группах жертв Чернобыльской аварии, выявленная при традиционном цитогенетическом анализе и с помощью метода FISH // *Международ. журн. радиац. медицины.* — 2000. — № 1 (5). — С. 83–95.
17. *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.* — 2001. — **35**, № 4. — С. 50–54.
18. *Burak I.I., Kodama Y., Nakano M. et al.* FISH examination of lymphocytes from Mayak workers for assessment of translocation induction rate under chronic radiation exposure // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2001. — **77**, № 8. — P. 901–908.
19. *Nakano M., Kodama Y., Ohtaki K. et al.* Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2001. — **77**, № 8. — P. 97–977.
20. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* FISH versus EPR dosimetry in Chernobyl liquidators // *Доп. НАН України.* — 2001. — № 2. — С. 185–189.
21. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Скалецкий Ю.М.* Використання методу FISH для верифікації доз опромінення у ліквідаторів Чорнобильської аварії // *Цитология и генетика.* — 2002. — **36**, № 5. — С. 16–20.
22. *Мазник Н.А., Винников В.А.* Уровень aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови у эвакуантов из 30-километровой зоны ЧАЭС и жителей радиационно загрязненных территорий в отдаленные сроки после Чернобыльской аварии // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 2002. — **42**, № 6. — С. 704–710.
23. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Дыбська О.Б., Педан Л.Р.* Цитогенетичне обстеження учасників ліквіда-

- ції наслідків Чорнобильської аварії за допомогою традиційного цитогенетичного аналізу та методу флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) // Журн. АМН України. — 2003. — 9, № 3. — С. 465—475.
24. Мазник Н.О. Стабільні аберації хромосом як довгостроковий маркер радіаційного впливу // Укр. радіол. журн. — 2003. — 11, вип.1. — С. 106—114.
 25. Pilinskaya M.A., Dibskiy S.S. Whole chromosome painting analysis of radiation induced chromosome aberrations in highly irradiated Chernobyl accident victims // *Cytogenetics and Cell Genetics : Abstracts of the 1st Eur. Cytogenet. Conf.*, 1997. — P. 73.
 26. Pilinskaya M.A., Dibskiy S.S. FISH analysis in Chernobyl liquidators 13 years following the accident // *QMC 2000: Proc. First Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics*. — 2000. — P. 25—27.
 27. Пилинская М.А., Дыбский С.С., Халвака И.Г. Использование метода FISH для обследования лиц, перенесших острую лучевую болезнь в связи с аварией на Чернобыльской АЭС // *Цитология и генетика*. — 1998. — 32, № 1. — С. 22—31.
 28. 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 // *Доп. НАН України*. — 1999. — № 7. — С. 169—173.
 29. 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. — 68. — P. 211—221
 30. 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. — 62, № 1. — P. 53—63.
 31. Lucas J., Hill F., Burk C. et al. Dose-response curve for chromosome translocations induced by low-dose rate ¹³⁷Cs gamma rays // *Radiat. Protect. Dosim.* — 1995. — 68. — P. 761—765.
 32. Sorokine-Durm I., Whitehouse C.A., Edwards A.A. The variability of translocation yields among control populations // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2000. — 88, № 1. — P. 93—100.
 33. Мазник Н.О., Винников В.А. Калібрувальні залежності «доза—ефект» для цитогенетичної біодозиметрії недавнього та віддаленого гамма-опромінення в низьких дозах // *Укр. радіол. журн.* — 2004. — 12, вип. 4. — С. 415.
 34. Домрачева Е.В. Цитогенетические эффекты малых доз облучения в лимфоцитах крови и клетках костного мозга : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2000. — 44 с.

Поступила 17.10.05