

РАДИАЦИОННАЯ
ГЕНЕТИКА

УДК 612.112.94:575.224.23:614.876:57.087.1:539.1.047

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ
ПОСЛЕ АВАРИЙНОГО ОБЛУЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ
ТРЕХЦВЕТНОГО FISH-МЕТОДА

© 2022 г. Е. Е. Ломоносова¹, В. Ю. Нугис^{1,*}, Г. П. Снигирёва², М. Г. Козлова¹,
В. А. Никитина¹, И. А. Галстян¹

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

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

*E-mail: nugisvju@list.ru

Поступила в редакцию 18.08.2021 г.

После доработки 04.11.2021 г.

Принята к публикации 09.11.2021 г.

Представлены результаты цитогенетического анализа с использованием в основном трехцветного FISH-окрашивания хромосом лимфоцитов периферической крови одного пациента, подвергнутого облучению в результате аварии на Чернобыльской АЭС в первоначально оцененной по частоте дицентриков дозе, равной 3.2 Гр. Материал был получен в общем временном промежутке 9053–12554 дней (24.8–34.4 года) после радиационного воздействия. Не всегда совместно во все сроки были использованы наборы ДНК-зондов к {1, 4, 12} и {2, 3, 8} парам хромосом. За весь период наблюдения геномная частота транслокаций (суммарно полных и неполных) статистически значимо не изменялась. Ретроспективные оценки дозы были произведены по полученным ранее *in vitro* зависимостям доза–эффект и располагались в диапазонах от 1.98 до 2.44 Гр и от 2.14 до 2.67 Гр при анализе метафаз всех клеток и только стабильных клеток соответственно. Обсуждается проблема учета клональных клеток с транслокациями хромосом.

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

DOI: 10.31857/S0869803122010064

В настоящее время для цитогенетической ретроспективной оценки дозы предлагается использовать цельнохромосомное FISH-окрашивание хромосом лимфоцитов периферической крови [1–5]. При этом наиболее часто применяется так называемый одноцветный вариант данной методики [6], хотя на самом деле подсчитывается число двуцветных структур, возникающих при обменах между обычно двумя-тремя парами каких-либо крупных хромосом, которые подверглись гибридизации с олигонуклеотидными ДНК-пробами, мечеными определенным флуоресцентным красителем, и остальными хромосомами, контрокрашенными с помощью других флуоресцентных красителей, например, DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) или йодида пропидия.

По-видимому, первая ясная демонстрация эффективности ретроспективного восстановления дозы с помощью FISH-метода была показана через 6 и 11 лет после инцидента на примере рабоче-

го, пострадавшего от ингаляционного поступления окиси трития, у которого доза на все тело по результатам измерения трития в моче и исходной частоты дицентриков в культуре лимфоцитов периферической крови составляла 0.47 и 0.38 Гр соответственно [7]. Увеличение времени после облучения не привело к уменьшению частоты FISH-регистрируемых транслокаций, а оценка дозы при объединении результатов обоих цитогенетических исследований была равна 0.48 Гр. В работе [8] представлены примеры нескольких других случаев удачного применения данного подхода в сравнении с данными исходной физической дозиметрии (0.30–0.56 Гр).

Для цитогенетической ретроспективной оценки дозы по частотам FISH-регистрируемых транслокаций, как и для оценки дозы в ближайшие сроки после облучения по частотам дицентриков, используют соответствующие кривые до-

за-эффект, полученные после облучения крови здоровых доноров *in vitro* [1, 8–11].

Однако при одноцветном FISH-варианте метода идентификация перестроек возможна только между FISH-окрашенными и контрокрашенными хромосомами. Обмены между самими FISH-окрашенными хромосомами оказываются неучтенными. Поэтому с целью увеличить число регистрируемых транслокаций, способствовать улучшению оценки радиочувствительности и выявлению сложных перестроек хромосом предложили использовать FISH-окрашивание различных комбинаций отдельных хромосом с помощью разных флуоресцентных красителей [12–15].

В настоящей работе представлены результаты цитогенетического анализа с использованием в основном трехцветного FISH-окрашивания хромосом лимфоцитов периферической крови одного пациента, подвергшегося облучению в результате аварии на Чернобыльской АЭС в общем временном промежутке 24.8–34.4 года после радиационного воздействия. Ранее нами с использованием трехцветного FISH-метода были получены кривые доза-эффект для суммарной частоты транслокаций во всех и только стабильных клетках в культурах лимфоцитов периферической крови трех здоровых доноров после γ -облучения *in vitro* [16]. Эти зависимости были использованы для ретроспективной оценки дозы у данного пациента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для цитогенетических исследований служила кровь, взятая из кубитальной (средней локтевой) вены в различные сроки после радиационного воздействия у пациента Г.О.И. (1960 г. р., УКН 1047), пострадавшего при ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г. Он был оператором центрального зала блока № 4 и в момент аварии находился в подсобном помещении за тонкой перегородкой в 20 м от реактора. Через 20 мин после того, как помещение заполнилось паром, он покинул разрушенный блок. Через 1 ч после аварии возникли слабость, головная боль, тошнота и рвота, продолжавшаяся в течение 2 сут. Жидкий стул был в течение первых суток. По данным цитогенетического исследования культуры лимфоцитов периферической крови средняя доза облучения на все тело по частоте дицентриков составила 3.2 Гр. Доза на щитовидную железу равнялась 11.28 Зв. После проведенного лечения в специализированной клинике пациенту был поставлен следующий диагноз: ОЛБ III степени тяжести от преимущественно внешнего относительно равномерного γ - β -облучения, аппликации и инкорпорации радионуклидов (^{131}I – 65 МБк), костномозговой синдром II степени, орофарингеальный синдром II степени, местные

лучевые поражения I, II и III степеней тяжести с поражением 8, 20 и 5% поверхности кожных покровов соответственно (грудь, предплечья, живот, правое бедро и обе ноги); острый гипотиреоз (по лабораторным данным). В отдаленный период после радиационного воздействия пациент подвергался многократным клиническим обследованиям, во время которых и производился забор крови для цитогенетических анализов.

Материал для данного исследования был получен в общем временном промежутке 9053–12554 дней (24.8–34.4 года) после радиационного воздействия.

Постановку в стерильных условиях культур лимфоцитов периферической крови производили по следующей методике. После самопроизвольного осаждения эритроцитов лейкоцитарную пленку с частью плазмы (общий объем 1 мл) добавляли к 9 мл среды RPMI 1640 с GlutaMAXTM-I (“Thermo Fisher Scientific”, США), содержащую также фитогемагглютинин в конечной концентрации 20 мкг/мл (ФГА-П, “ПанЭко”, Россия) и антибиотики стрептомицин и пенициллин (растворены предварительно в среде). Культивирование производили в стерильных культуральных флаконах 25 см² (“NUNC”) в вертикальном положении. Для того, чтобы избежать появления в культурах естественного числа метафаз во втором митозе, время инкубации в термостате при 37°C составило 48 ч. За 2–2.5 ч до его окончания в культуральную среду добавляли колхицин (0.5 мкг/мл) для остановки протекания митозов в стадии метафазы.

Препараты хромосом готовили принятым в лаборатории стандартным способом [16].

Для выполнения FISH-окрашивания хромосом использовали готовые наборы цельнохромосомных ДНК-зондов фирмы “MetaSystems” (Германия). Однако в разные сроки после радиационного воздействия они могли быть различными: одноцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом (1 раз), трехцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом (5 раз), параллельно два набора трехцветных ДНК-зондов к {1, 4, 12} и {2, 3, 8} парам хромосом (5 раз). Контркрасителем служила флуоресцентная краска DAPI.

Отметим, что суммарно в этих наборах хромосом относительное содержание ДНК почти совпадает: в соответствии с данными, приведенными в рекомендациях [1], доля ДНК в них по отношению к мужскому диплоидному набору хромосом равняется 0.1917 и 0.1966 соответственно.

При обработке и окраске препаратов хромосом руководствовались фирменными инструкциями, прилагаемыми к наборам.

Для автоматического поиска метафаз на разных препаратах и осуществления собственно цитогенетического исследования пользовались си-

стемой “Метафер 4” (фирма “MetaSystems”, Германия). Критериями отбора метафаз для анализа служили наличие в них квазидиплоидного числа хромосом (40–46) и полный набор всех FISH-окрашенных хромосом с учетом всей их суммарной длины. Это согласуется с данными работы [11], показавшей, что при учете метафаз только с 46 центромерами частота транслокаций была сравнима с их уровнем при анализе метафаз с 38–46 центромерами. В соответствии с таким подходом метафазы, содержавшие делеции по FISH-окрашенным хромосомам, не вошли в итоговые результаты анализа, которые содержали только перестройки хромосомного типа, в продукции которых участвовали FISH-окрашенные участки или целые хромосомы (все транслокации, инсерции, инверсии, дицентрики, центрические кольца, ацентрики).

Перевод наблюдаемых частот транслокаций в геномные частоты с целью возможности их сравнения осуществляли с помощью соответствующих уравнений для одноцветного и трехцветного методов [1]. Уточним, что геномная частота в данном случае связана с геном-эквивалентной экстраполяцией.

При проведении цитогенетического анализа учитывали нахождение aberrаций хромосом в стабильных и нестабильных клетках. К цитогенетически стабильным клеткам относили неаббертантные метафазы и метафазы, содержавшие только стабильные перестройки хромосом – реципрокные транслокации, перицентрические инверсии, инсерции (вставки), контрокрашенные атипичные хромосомы. В нестабильных клетках могли находиться только нестабильные aberrации хромосом – FISH-окрашенные и контрокрашенные дицентрики, центрические и ацентрические кольца, парные фрагменты – или они же в сочетании со стабильными перестройками. Таким образом, при определении стабильности клеток учитывали не только aberrации по FISH-регистрабельным, но и по видимым контрокрашенным хромосомам. При этом, если не удавалось произвести точную идентификацию любых контрокрашенных перестроек, то такие клетки считались стабильными при отсутствии или стабильности FISH-окрашенных aberrаций.

Для статистической обработки полученных результатов (сравнение средних и регрессионный анализ) использовали пакет программ Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови пациента Г.О.И. в отдаленные сроки после радиационного воздействия. В ней показаны как реально обнаруженные частоты

aberrаций хромосом, так и геномные частоты транслокаций, рассчитанные в зависимости от использованного набора ДНК-зондов по соответствующим формулам [1]. Следует обратить внимание на то, что наблюдались метафазные клетки с обменом дистальными участками между тремя хромосомами как бы “по кругу”, т.е. происходили три разрыва в трех хромосомах, а затем возникали двухцветные структуры следующего вида: FISH-окрашенный “краской 1” центромерный участок + контрокрашенный бесцентромерный участок, FISH-окрашенный “краской 2” центромерный участок + FISH-окрашенный “краской 1” бесцентромерный участок, контрокрашенный центромерный участок + FISH-окрашенный “краской 2” бесцентромерный участок. Обнаружение таких структур возможно только при трехцветном (мультицветном) FISH-окрашивании хромосом. Как известно, при одной простой транслокации происходит два разрыва в двух хромосомах, при двух независимых транслокациях – четыре разрыва в четырех хромосомах. Для итоговой количественной оценки описываемого обмена участками между тремя хромосомами, по-видимому, следует считать, что, как это и не парадоксально, произошло 1.5 транслокации, что и отразилось на данных, представленных в табл. 1. С позиций действующего определения сложных (комплексных) перестроек хромосом, заключающегося в превышении хотя бы на единицу числа разрывов над числом вовлеченных в процесс хромосом [1], данный феномен не относится к указанному типу aberrаций, хотя стандартные инсерция или инверсия формально уже являются сложными перестройками. Вероятно, надо более подробно рассмотреть вопрос о значении дефиниций “простые” и “сложные” aberrаций.

Основную массу обнаруженных aberrаций хромосом составили реципрокные транслокации, количество которых варьировало от 90.4 до 98.4% от общего числа всех зарегистрированных FISH-окрашенных перестроек. Доля нестабильных aberrаций колебалась от 0 до 7.6%. Частота транслокаций на геном при анализе всех клеток была значимо в 42–67 раз выше ($p < 0.01$), чем для соответствующего возрастного контроля, приведенного в работе [16].

В результате осуществления цитогенетического анализа с помощью трехцветного FISH-метода были выделены, насколько это возможно при данной окраске хромосом, два клона лимфоцитарных клеток с определенными транслокациями, которые были обозначены как $t(4; 8)$ и $t(1; 3)$. Первая транслокация при использовании одноцветных и трехцветных ДНК-зондов для 1, 4 и 12 пар хромосом выглядит как транслокация (4; ?), а при использовании трехцветных ДНК-зондов для 2, 3 и 8 пар хромосом выглядит как транслока-

Таблица 1. Результаты цитогенетического трехцветного FISH-анализа культур лимфоцитов периферической крови пациента Г.О.И., пострадавшего при аварии на Чернобыльской АЭС, при использовании ДНК-зондов для 1, 4 и 12 или 2, 3 и 8 пар хромосом
Table 1. The results of a cytogenetic three-color Fish-analysis of peripheral blood lymphocyte cultures of patient G.O.I., affected by the accident at the Chernobyl NPP, when using DNA probes for 1, 4 and 12 or 2, 3 and 8 pairs of chromosomes

Дата взятия материала	День после облучения	Число всех клеток	Число стабильных клеток	Число транслокаций	Частота транслокаций на 100 клеток		Частота инверсий на 100 клеток	Частота делеций на 100 клеток	Частота центрических колец на 100 клеток	Частота ацентриков на 100 клеток	Частота транслокаций на 100 клеток на весь геном	
					все клетки	стабильные клетки					все клетки	стабильные клетки
07.02.11	9053 ¹	260	259	28	10.77	10.42	0	0	0	0.38	33.90	32.82
25.03.14	10195 ²	1007	1005	124.5	12.36	12.39	0	0.20	0	0	36.20	36.27
20.10.14	10404 ²	1116	1094	143	12.81	12.80	0.09	0.18	0.09	0.36	37.52	37.47
21.04.15	10587 ²	919	913	106	11.53	11.50	0.22	0.22	0	0.22	33.77	33.67
22.03.16	10923 ²	986	978	162.5	16.48	16.21	0.58	0	0	0.39	48.25	47.45
06.12.16	11182 ²	848	833	142.5	16.80	16.63	0.24	0.12	0	1.30	49.20	48.68
06.12.16	11182 ³	1100	1095	163	14.82	14.79	0.18	0	0	0.18	42.44	42.37
18.04.17	11315 ²	917	906	137	14.94	14.46	0.11	0.22	0	0.11	43.74	42.34
18.04.17	11315 ³	838	834	115	13.72	13.79	0.36	0	0	0.12	39.30	39.49
29.11.17	11540 ²	1727	1714	200	11.58	11.67	0.12	0.23	0	0.52	33.91	34.16
10.04.18	11672 ²	882	873	130	14.74	14.78	0.11	0.11	0.11	0.57	43.16	43.26
10.04.18	11672 ³	839	828	104.5	12.46	12.26	0.12	0	0	0.24	35.67	34.94
19.02.19	11987 ²	999	987	121	12.11	11.85	0.30	0.10	0	0.20	35.46	34.71
19.02.19	11987 ³	1102	1087	155.5	14.11	14.03	0.09	0.09	0	0.45	40.41	40.18
08.09.20	12554 ²	923	915	139	15.06	15.08	0.22	0.11	0	0	44.09	44.16
08.09.20	12554 ³	687	682	102.5	14.92	15.03	0.58	0	0	0	42.73	43.05

Примечание. ¹ Одноцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом.

² Трехцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом.

³ Трехцветные ДНК-зонды для 2, 3 и 8 пар хромосом.

Таблица 2. Клоны клеток по результатам цитогенетического трехцветного FISH-анализа культур лимфоцитов периферической крови пациента Г.О.И., пострадавшего после аварии на Чернобыльской АЭС, при использовании ДНК-зондов для 1, 4 и 12 и для 2, 3 и 8 пар хромосом

Table 2. Cell clones according to the results of cytogenetic three-color Fish-analysis of peripheral blood lymphocyte cultures of patient G.O.I., affected by the accident at the Chernobyl NPP, when using DNA probes for 1, 4 and 12 and for 2, 3 and 8 pairs of chromosomes

Дата взятия материала	День после облучения	Частота транслокаций на 100 стабильных клеток			Процент клоновых транслокаций от всех транслокаций в стабильных клетках	
		все	транслокация (4; 8)	транслокация (1; 3)	транслокация (4; 8)	транслокация (1; 3)
07.02.11	9198 ¹	10.42	0	0	0	0
25.03.14	10195 ²	12.39	0	0.40	0	3.21
20.10.14	10404 ²	12.80	1.37	0.09	10.71	0.71
21.04.15	10587 ²	11.50	1.64	0.44	14.29	3.81
22.03.16	10923 ²	16.21	2.76	0.61	17.03	3.79
06.12.16	11182 ²	16.63	3.84	0	23.10	0
06.12.16	11182 ³	14.79	3.11	0.46	20.99	3.09
18.04.17	11315 ²	14.46	1.43	0.22	9.92	1.53
18.04.17	11315 ³	13.79	0.48	0.36	3.48	2.61
10.04.18	11672 ²	14.78	1.72	0	11.63	0
10.04.18	11672 ³	12.26	1.21	0	9.80	0
19.02.19	11987 ²	11.85	0.61	0	5.13	0
19.02.19	11987 ³	14.03	1.47	0.09	10.56	0.66
08.09.20	12554 ²	15.08	2.51	0	16.67	0
08.09.20	12554 ³	15.03	2.64	0.15	17.56	1.95

Примечания. ¹ Одноцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом.

² Трехцветные ДНК-зонды для 1, 4 и 12 пар хромосом.

³ Трехцветные ДНК-зонды для 2, 3 и 8 пар хромосом.

ция (?; 8). Соответственно вторая транслокация при применении одноцветных и трехцветных ДНК-зондов для 1, 4 и 12 пар хромосом выглядит как транслокация (1; ?), а при использовании трехцветных ДНК-зондов для 2, 3 и 8 пар хромосом выглядит как транслокация (?; 3). В табл. 2 приведены частоты этих клоновых транслокаций. В дальнейшем расчеты общих частот транслокаций были выполнены без коррекции и с коррекцией на этот феномен. Коррекция на наличие клонов заключалась в представлении каждого из них в виде одной клетки с соответствующим вычитанием остального клона из общего числа транслокаций и клеток.

В наиболее раннем в данном исследовании сроке взятия крови через 9053 дня (24.8 года) после аварии использовали одноцветные ДНК-пробы для 1, 4 и 12 пар хромосом. При последующих заборах материала (в общей сложности 10 раз) при окрашивании применяли трехцветные ДНК-зонды только для 1, 4 и 12 пар хромосом (5 сроков) или параллельно для {1, 4, 12} и {2, 3, 8} пар хромо-

сом (другие 5 сроков). Сравнение геномных частот транслокаций для разных наборов ДНК-зондов с помощью критерия знаков для связанных выборок продемонстрировало отсутствие различий между ними при анализе как всех, так и только стабильных клеток без и с коррекцией на наличие клонов ($p = 0.371$).

Частоты наблюдаемых транслокаций во всех и стабильных клетках без и с коррекцией на наличие клонов также существенно не отличались друг от друга (критерий знаков для связанных выборок: $p = 0.453$ и 0.423 соответственно).

Изучение зависимости частоты транслокаций от времени после облучения было осуществлено с помощью получения соответствующей линейной регрессии для геномных частот, определенных на основе пересчета наблюдаемых частот этих аберраций при использовании одноцветного и трехцветного ДНК-зондов для 1, 4 и 12 пар хромосом. Коэффициенты корреляции составили 0.388 и 0.417 при уровнях значимости $p = 0.239$ и 0.231 соответственно для данных без и с коррекцией на

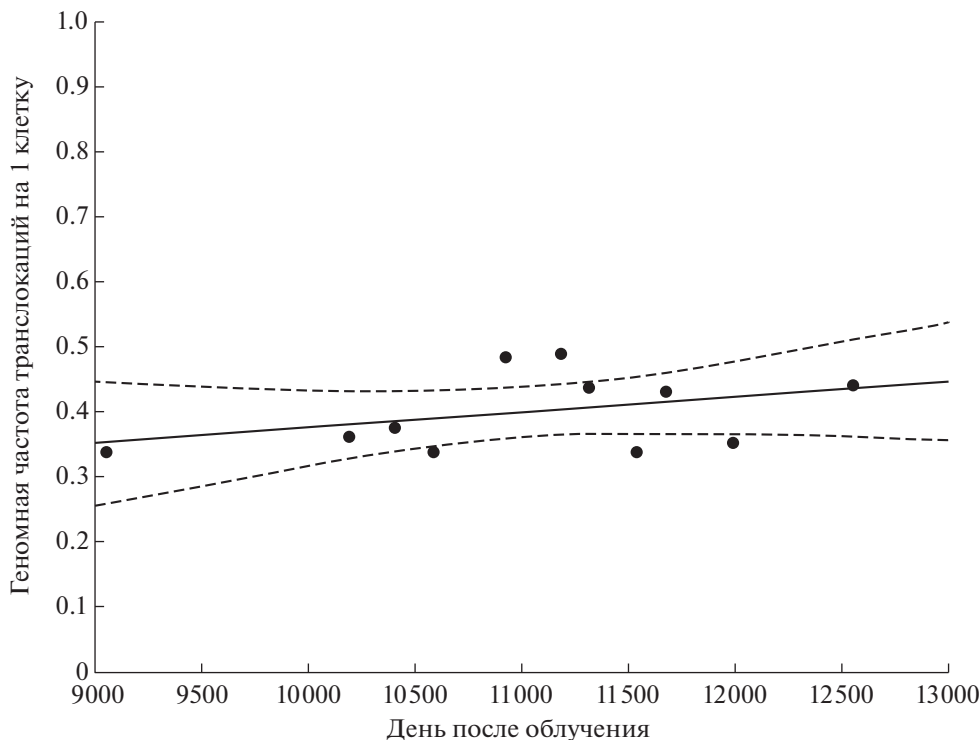


Рис. 1. Зависимость геномной частоты транслокаций, выявленных с помощью одноцветного и трехцветного FISH-окрашивания для ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом (сплошная линия – линейная регрессия, пунктирные линии – границы 95%-ного доверительного интервала), от времени после облучения.

Fig. 1. The dependence of the genomic frequency of translocations identified using one-color and three-color FISH staining for DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes (solid line – linear regression, dotted lines – borders of 95% confidence interval), from time after irradiation.

наличие клоновых транслокаций, что демонстрирует отсутствие статистически существенной зависимости уровня транслокаций от срока взятия крови в период от 24.8 до 34.4 года после облучения пациента. Соответствующий график для транслокаций без коррекции представлен на рис. 1.

Для ретроспективной оценки дозы у пациента Г.О.И. были использованы фактические данные, полученные в работе [16]. В ней были построены кривые доза–эффект для радиационно-индуцированных транслокаций в лимфоцитах периферической крови после γ -облучения крови здоровых доноров *in vitro* в дозах от 0.1 до 3 Гр. Для учета перестроек хромосом использовали трехцветное FISH-окрашивание с помощью ДНК-зондов к {1, 4, 12} или {2, 3, 8} парам хромосом отдельно. При этом, как было установлено, вид набора ДНК-зондов не влиял на выявленные частоты транслокаций. Так как в указанной статье [16] были приведены калибровочные кривые для наблюдаемых уровней транслокаций, то применительно к настоящему исследованию после вычитания из зарегистрированных частот контрольных величин был осуществлен пересчет в соответствии с известными формулами [1] для получения радиационно-индуцированных ге-

номных частот. Регрессионный анализ по методу наименьших квадратов позволил установить следующие линейно-квадратичные дозовые зависимости для уровней транслокаций при цитогенетическом исследовании всех (1) и только стабильных (2) клеток соответственно:

$$Y = C + (3.96 \pm 1.31)D + (6.58 \pm 0.54)D^2, \quad (1)$$

$$Y = C + (5.56 \pm 1.23)D + (4.71 \pm 0.50)D^2, \quad (2)$$

где Y – геномная частота транслокаций на 100 клеток, C – постоянный коэффициент, равный фоновой средней геномной частоте транслокаций с учетом возраста обследуемого лица, D – доза, Гр. Коэффициент C для пациента Г.О.И. брался из статьи [17]: для возрастов 50–59 и 60–69 лет он составлял 0.00732 и 0.01008 соответственно. Действительно, в настоящее время сведения о фоновых уровнях транслокаций при использовании трехцветного FISH-окрашивания очень ограничены и по ним сложно составить суждение о наличии или отсутствии их зависимости от возраста обследуемых людей. Однако, исходя из установленных в разных работах (например, [17]) возрастных зависимостей фоновых частот транслокаций при использовании одноцветного FISH-метода, мож-

но первоначально использовать эти данные и в случае применения трехцветного FISH-метода хромосом, так как в контрольной популяции и в диапазоне малых доз вероятность появления транслокаций между FISH-окрашенными хромосомами должна быть очень низка.

Рассчитанные величины доз при анализе всех и только стабильных клеток без и с проведением коррекции на наличие клонов представлены в табл. 3. Хотя в каждый срок забора материала различия между дозами, оцененными при исследовании всех и только стабильных клеток без коррекции на клоны, не были большими и колебались от 6.9 до 9.8%, составляя в среднем 2.16 ± 0.04 и 2.34 ± 0.04 , однако дозы, определенные по уравнению (2), были регулярно выше доз, полученных с использованием уравнения (1), что привело к существенной статистической разнице между ними. Это показано с помощью критерия знаков для связанных выборок ($p = 0.0002$). Точно так же дело обстояло и после проведения коррекции на наличие клонов ($p = 0.017$). Естественно, дозы после коррекции на наличие клонов были несколько ниже, чем без такой коррекции.

Таблица 4 демонстрирует относительное участие выбранных FISH-окрашенных пар хромосом в различных транслокациях. Более подробно эти данные будут рассмотрены ниже.

ОБСУЖДЕНИЕ

При описании наблюдаемых перестроек мы исходили из традиционной терминологии, не обращаясь к специально разработанным для FISH-метода системам PAINT или S&S, что в международных методических рекомендациях считается допустимым [1]. При этом обнаруженные транслокации учитывались суммарно и не разделялись на полные/неполные (реципрокные/нереципрокные, двунаправленные/однонаправленные). В данной ситуации на самом деле речь идет о разрешающей способности FISH-метода. В одной из работ полагается, что ее граница составляет 10–50 тыс. пар оснований [18]. Правда, другие авторы [19] обосновывают существенно более высокую величину данного порога разрешения: $(11.1 \pm 0.8) \times 10^6$ и $(14.6 \pm 0.6) \times 10^6$ пар оснований для окрашенных и неокрашенных участков хромосом соответственно. В то же время, как отмечено в [20], длина теломер в хромосомах человека составляет 5–15 тыс. пар оснований, а они идентифицируются с помощью FISH-метода, хотя в настоящее время для этого используются не ДНК-зонды, а более эффективные PNA-пробы (PNA, Peptide nucleic acid – пептидо-нуклеиновые кислоты, созданные искусственно) [21]. С помощью мечения теломер хромосом облученных лимфоцитов было продемонстрировано, что многие, якобы реципрокные транслокации

на молекулярном уровне оказываются реципрокными, и частота неполных обменов является очень низкой [22]. По данным работ [23–25], доля неполных транслокаций составляет примерно 3–5%. Таким образом, на самом деле видимая “односторонность” транслокации не обеспечивает надежную оценку неполноты или реципрокности обмена [1]. Также отметим, что, по-видимому, без теломерных проб различные специалисты-цитогенетики могут по-разному оценивать полноту транслокаций.

Для ретроспективной оценки дозы по частоте реципрокных транслокаций, включая использование FISH-метода, изначально исходили из мнения об их постоянстве с течением времени после облучения. Однако результаты цитогенетических исследований через 8 и 10 лет после аварий в г. Гойяния (Бразилия, 1987 г.) [26] и на Чернобыльской АЭС (1986 г.) [27] показали, что в общем случае это не так. Действительно, в указанных исследованиях было продемонстрировано, что при первоначально оцененных дозах соответственно больше 1 и 2 Гр частоты всех зарегистрированных FISH-транслокаций оказывались меньше исходно выявленных частот дицентриков, хотя, предполагая равновероятную индукцию дицентриков и реципрокных транслокаций, частота последних в отдаленные сроки должна была быть равной начальной частоте дицентриков. По-видимому, такой эффект был обусловлен элиминацией как стабильных, так и нестабильных аберраций при их совместном нахождении в одних и тех же клетках.

Ранее также было проведено изучение динамики (до 25 лет после облучения) уровней FISH-зарегистрированных транслокаций у лиц, пострадавших при аварии на Чернобыльской АЭС и сгруппированных по степени тяжести развившейся острой лучевой болезни (ОЛБ), которая зависела от величины поглощенной дозы [28]. Во всех группах, включая 1-ю степень тяжести ОЛБ, уровни транслокаций существенно превышали спонтанный уровень и в общем временном промежутке не имели явной тенденции к снижению своей частоты, за исключением случаев с ОЛБ 1-й степени. Время снижения количества транслокаций до некоторого постоянного уровня было оценено величиной 5–8 лет интенсивной элиминации нестабильных аберрантных клеток, включавших в определенной своей части и транслокации. В последующие сроки аберрантные клетки содержали главным образом аберрации стабильного типа.

В 1994 г. в Эстонии произошел радиационный инцидент с похищением из хранилища радиоактивных отходов источника γ -излучения с последующим его нахождением в частном доме [29]. Для дальнейших цитогенетических исследований

Таблица 3. Рассчитанные величины доз при FISH-анализе всех и только стабильных клеток в культурах лимфоцитов периферической крови пациента Г.О.И. в разные сроки после облучения без и с коррекцией на наличие клонов

Table 3. The calculated values of doses with Fish-analysis of all and only stable cells in the peripheral blood lymphocyte cultures of patient G.O.I. in different times after irradiation without and with correction for clones

День после облучения	Вариант FISH-окрашивания	Доза (Гр), анализ всех клеток		Доза (Гр), анализ стабильных клеток	
		коррекция на клоны		коррекция на клоны	
		нет	есть	нет	есть
9053	Одноцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	1.98	—	2.16	—
10195	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.06	2.02	2.24	2.09
10404	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.10	1.97	2.29	2.19
10587	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	1.98	1.79	2.14	2.13
10923	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.42	2.17	2.63	1.92
11182	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.44	2.16	2.67	2.34
11182	Трехцветный, ДНК-зонды к 2, 3 и 8 парам хромосом	2.25	1.97	2.46	2.33
11315	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.29	2.19	2.48	2.13
11315	Трехцветный, ДНК-зонды к 2, 3 и 8 парам хромосом	2.15	2.09	2.36	2.33
11540	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	1.98	—	2.16	—
11672	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.27	2.13	2.49	2.33
11672	Трехцветный, ДНК-зонды к 2, 3 и 8 парам хромосом	2.04	1.93	2.19	2.07
11987	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.03	1.97	2.18	2.11
11987	Трехцветный, ДНК-зонды к 2, 3 и 8 парам хромосом	2.18	2.06	2.38	2.23
12554	Трехцветный, ДНК-зонды к 1, 4 и 12 парам хромосом	2.30	2.09	2.52	2.28
12554	Трехцветный, ДНК-зонды к 2, 3 и 8 парам хромосом	2.26	2.03	2.49	2.22
Среднее \pm SE		2.16 \pm 0.04	2.04 \pm 0.03	2.34 \pm 0.04	2.19 \pm 0.03

у трех человек из общей группы пострадавших важно то, что имелись исходные результаты FISH-анализов [30, 31]. Оцененные средние дозы на все тело у двух пациентов составили примерно 1 Гр, а у третьего — 2.7 Гр, причем у всех имелись ожоги на руках и были обнаружены цитогенетические признаки парциального радиационного воздействия. В первые четыре года было показано снижение частот транслокаций до 70% от перво-

начального уровня, по мнению авторов, более медленное для полных, чем для всех транслокаций, хотя отмечается, что это различие не было статистически существенным. Продолжение исследований до семи лет после инцидента показало стабилизацию количества транслокаций, делая очевидным достижения минимального уровня в течение первых двух лет. При этом через 5, 6 и 7 лет наблюдалось очень мало дицентриков,

Таблица 4. Участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных двуцветных транслокациях с контрокрашенными хромосомами у пациента Г.О.И. суммарно по всем срокам забора материала
Table 4. Participation of different Fish-colored chromosomes in radiation-induced translocations with counterstained chromosomes of the patient G.O.I. total for all terms of sampling

ДНК-зонды и коррекция на наличие клонов	Число (доля) транслокаций следующих пар FISH-окрашенных хромосом с контрокрашенными хромосомами				Число транслокаций между FISH-окрашенными хромосомами
	1	4	12	сумма	
ДНК-зонды к 1, 4 и 12 хромосомам					
Нет	610 (45.4%)	497 (37.0%)	236 (17.6%)	1343 (100%)	85.5
Есть*	511 (51.7%)	279 (28.42%)	198 (20.0%)	988 (100%)	
ДНК-зонды к 2, 3 и 8 хромосомам					
Нет	204 (34.0%)	186 (30.9%)	211 (35.1%)	601 (100%)	38.5
Есть	204 (39.5%)	179 (34.6%)	134 (25.9%)	517 (100%)	

Примечание. * Культура лимфоцитов от 29.11.17 не бралась в расчет, так как она не была проанализирована на наличие клоновых транслокаций.

ацентриков и сложных обменов. В конце концов был сделан вывод, что содержание транслокаций в стабильных клетках в течение первых двух лет равно этому показателю в более поздние времена. Таким образом, первоначальное снижение выхода транслокаций было вызвано в основном, если не полностью, путем элиминации нестабильных клеток, и для ретроспективной оценки дозы цитогенетический анализ необходимо проводить в стабильных клетках [31, 32]. Однако эти данные в том числе означают, что в нестабильных клетках в ближайшие сроки после облучения содержится больше реципрокных транслокаций, чем в стабильных, что довольно удивительно. Отметим, что в нашем исследовании, посвященном построению *in vitro* кривых доза—эффект для транслокаций, выявляемых с помощью трехцветного FISH-метода, также наблюдалась значимо или в виде тенденции более высокая частота транслокаций во всех клетках по сравнению с только стабильными клетками при наибольших использованных дозах (2 и 3 Гр) [17].

В работе Y. Chen et al. (2009) были представлены результаты продолжительного цитогенетического обследования пяти выживших пострадавших (двое погибли) после серьезной радиационной аварии 25 июня 1990 г. в Китае (г. Шанхай) [4]. В ходе этого наблюдения были использованы три различных цитогенетических метода: 1) классический, 2) G-бэндинг и 3) FISH-окрашивание 1 пары хромосом. Первоначальная оценка дозы варьировала от 1.9 до 5.1 Гр. К сожалению (по-видимому, из-за ограниченной возможности забора материала), сроки взятия крови после аварии для разных методик были в целом не одинаковы, составляя для 1) 24 ч; 3,5; 5; 6; 9; 12; 14 и 17 лет; для 2) 5; 12; 14; 17 лет и для 3) 8; 9 и 12 лет соответ-

ственно. К 12-му году после облучения количество дицентриков и колец уменьшилось больше чем на 90%. Частота же стабильных аберраций была существенно выше, чем в контроле, и зависела от дозы. При использовании G-бэндинга уровень транслокаций был несколько больше через 5 лет, чем в последующие сроки, когда он мало изменялся. Количество FISH-регистрируемых транслокаций у четырех пациентов с течением времени несколько снижалось в разной степени, оставаясь на примерно одном уровне у пятого пострадавшего. В целом у авторов создалось впечатление, что, чем большая доза была получена, то с тем меньшей скоростью частота транслокаций снижалась со временем, что находится в противоречии с данными работ [26, 27, 31].

Как указывалось выше, этап цитогенетических исследований, представленный в настоящей статье, начался примерно через четверть века после чернобыльской аварии и продолжался около 10 лет. За этот период, как показал регрессионный анализ, частота транслокаций существенно не изменилась и колебалась в границах от 33.8 до 49.2 на 100 клеток (на геном) при использовании одноцветных и трехцветных ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом. Ранее пациент Г.О.И. попал в группу лиц, которые были обследованы в одной из германских клиник примерно через 5.5 года после радиационного воздействия [33]. В программу обследования входило и проведение цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови с помощью одноцветного FISH-окрашивания 1, 4 и 12 пар хромосом. Геномная частота всех транслокаций составила у него 26.3 на 100 клеток. Критерий для отбрасывания крайних вариантов не смог продемонстрировать ответственность отличия этой величины от совокуп-

ности данных, полученных в настоящей работе: $\tau = 0.328$ при $\tau_{0.05} = 0.428$ [34]. С другой стороны, при построении линейной регрессии с учетом этой ранее полученной варианты коэффициент корреляции составил 0.645 при уровне значимости $p = 0.0235$. Можно ли предположить на этой основе, что все-таки имело место некоторое повышение уровня всех транслокаций через 24.8–34.4 года по сравнению с их частотой через 5.5 года после облучения? Вопрос остается открытым, так как имеется вероятность наличия межлабораторных различий при цитогенетической регистрации транслокаций, что может быть допущено из сведений работы [29].

В целом, исходя из данных литературы и настоящего исследования, ситуация выглядит таким образом, что в первые годы после облучения (2–8 лет) в процессе элиминации огромного большинства нестабильных клеток частота транслокаций снижается до какого-то зависящего от дозы уровня, который затем почти не изменяется. При этом после облучения в дозах 1 Гр и ниже уровень транслокаций практически не изменяется [35].

Необходимо еще раз подчеркнуть, что в нашем исследовании количества транслокаций во всех и стабильных клетках значимо не отличались друг от друга, а различия в дозах были обусловлены только ходом полученных ранее кривых доза–эффект, в которых имелись расхождения в частотах транслокаций только при дозах 2 и 3 Гр. При этом различия оценок доз у больного Г.О.И. в численном отношении были минимальны (до 8%). Поэтому, с нашей точки зрения, в отдаленные сроки после облучения, собственно говоря, не очень важно анализируются все клетки или только стабильные, особенно, если полученные дозы были меньше 2 Гр. Да и самих нестабильных аберраций, а соответственно, и нестабильных клеток в определенных сроки становится крайне мало.

На постоянство величины регистрируемых частот радиационно-индуцированных транслокаций могут влиять такие факторы как наличие длительно живущих фракций лимфоцитов или клоновых транслокаций в линиях клеток, берущих начало от соответствующих стволовых клеток [35]. Как считает J.D. Tucker (2008), может быть два подхода к вопросу о клетках с клоновыми аберрациями: их учет с признанием, что имеет место единичное событие, т.е. одна клетка, или игнорирование этого обстоятельства, признавая каждую транслокацию как независимое событие [36]. В подтверждение последней точки зрения приводится то рассуждение, что, собственно говоря, все лимфоциты, в том числе и нормальные, имеют клоновую природу. Задавшись вопросом, какую же стратегию выбрать, автор предлагает при индивидуальных оценках учи-

тывать наличие аномальных клонов, а при популяционном оценивании доз не делать этого. Учитывая данные, полученные в настоящей статье, по-видимому, будет достаточно допустимо не приводить коррекцию на наличие клонов даже при ретроспективных оценках доз у отдельных пострадавших. Разумеется, это относится только к случаям без образования многоклеточных злокачественных клонов. В целом ретроспективные оценки дозы у пациента Г.О.И. были в среднем примерно на 30% ниже, чем первоначальная оценка по частоте дицентриков.

Как уже указывалось, в табл. 4 показаны количественные данные об участии различных FISH-окрашенных хромосом в их транслокациях с контрокрашенными хромосомами, а также общее число транслокаций между FISH-окрашенными хромосомами. Без и с коррекцией на наличие клонов для набора ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом по частоте образования транслокаций с контрокрашенными хромосомами FISH-окрашенные хромосомы располагались в следующем порядке: $1 > 4 > 12$ ($p < 0.0001$). Для набора ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом без указанной коррекции существенных различий между этими хромосомами не наблюдалось ($p = 0.125–0.671$), несмотря на установленную разницу относительного содержания ДНК в них. После коррекции по степени участия в этих транслокациях наблюдалось следующее расположение рассматриваемых хромосом: $2 > 8$ ($p < 0.0001$) и $3 > 8$ ($p = 0.023$). Различия между парами хромосом 2 и 3 было незначимым ($p = 0.108$). Интересно, что последний факт наблюдался и в статье [16].

Также по методу, описанному в работе [34], было осуществлено сравнение между эмпирическими и расчетными частотами участия отдельных FISH-окрашенных пар хромосом в транслокациях, исходя из табличных величин относительного содержания в них ДНК [1]. Были получены противоречивые результаты. Так, при использовании набора ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом без коррекции на наличие клонов доля транслокаций с участием хромосомы 1 соответствовала ее относительной длине, тогда как для хромосом 4 и 12 этот показатель был значимо (при $p < 0.05$) соответственно выше и ниже расчетных значений. После коррекции на наличие клонов для хромосомы 1 участие в транслокациях было выше ожидаемого, а для хромосом 4 и 12 – ниже ожидаемого. При применении набора ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом без коррекции на наличие клонов транслокаций с 2 и 8 хромосомами было соответственно меньше и больше предполагаемой частоты, а для хромосомы 3 их количество не отличалось от теоретических ожиданий (при $p < 0.05$). После проведения коррекции для всех хромосом данного набора различия по ожидаемому количеству транслока-

ций с контрокрашенными хромосомами отсутствовали. По-видимому, такое расхождение результатов, полученных с использованием разных наборов ДНК-зондов, обусловлено наличием нераспознанного(ых) клон(ов) с участием 1 хромосомы. Возрастание доли транслокаций с участием этой хромосомы автоматически приводит к снижению вклада других хромосом из используемого набора ДНК-зондов. В основе данной точки зрения лежит представление о прямо пропорциональной зависимости величины вероятности индукции двойных разрывов ДНК ее относительному содержанию в отдельных парах хромосом [1], хотя ряд авторов не согласны с этим положением [37–39]. В статье [16] после γ -облучения крови здоровых доноров *in vitro* и трехцветного FISH-окрашивания с помощью тех же, как и в данной работе, наборов ДНК-зондов существенные различия между эмпирическими и расчетными вкладами отдельных пар хромосом в образование радиационно-индуцированных транслокаций не наблюдались. Таким образом, если производится оценка сравнительного участия разных хромосом в реципрокных транслокациях, то, в отличие от ретроспективной оценки дозы, осуществление коррекции на наличие клональных перестроек становится обязательным. Отклонения же частот участия в транслокациях отдельных хромосом от ожидаемых величин, исходя из содержания в них ДНК, по-видимому, может свидетельствовать о нераспознанных клонных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в настоящей статье с помощью трехцветного FISH-окрашивания было проведено цитогенетическое исследование культур лимфоцитов периферической крови пациента, подвергшегося радиационному воздействию в дозе 3.2 Гр (оценка по частоте дицентриков) при аварии на Чернобыльской АЭС. Общая длительность данного наблюдения составила приблизительно 10 лет, начиная с около 25 лет после облучения. В различные сроки были применены разные наборы ДНК-зондов. Геномные частоты транслокаций не зависели от выбранного набора и были примерно одинаковы на протяжении всего периода исследования. Для ретроспективного определения дозы использовали калибровочные кривые для частот радиационно-индуцированных транслокаций, полученные ранее в экспериментах с облучением крови здоровых доноров *in vitro*. В целом средняя величина этой оценки составила приблизительно 2.2 Гр, демонстрируя частичное снижение исходной частоты транслокаций, по-видимому, вследствие элиминации нестабильных клеток, в которых стабильные и нестабильные aberrации хромосом находились вместе.

Хотя ретроспективная оценка дозы была более высокая при анализе только стабильных клеток, однако в чисто численном плане разница с результатами, полученными при анализе всех клеток, была очень небольшой. Поэтому, по-видимому, с практической точки зрения проблема, какие клетки учитывать, является не очень важной. Гораздо более критическим является знание того, какой должна быть величина необходимой коррекции при ретроспективных оценках исходно различных доз, больших 1 Гр, если такая необходимость возникнет.

Относительно наличия клонов клеток с транслокациями хромосом складывается впечатление, что при клинической относительной норме значение этого фактора для ретроспективной оценки дозы также сильно преувеличено. Да, их учет приводит к уменьшению величины оценки дозы, но при дозах больше 1 Гр она уже снижена, а при меньших дозах вероятность появления клон, скорее всего, невелика. Если же клон приобретет черты злокачественности, то при ретроспективной оценке дозы данное обстоятельство придется учитывать. Правда, при этом возникнут совершенно другие медицинские проблемы, на которые будет обращено основное внимание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
2. Balajee A.S. Applications of fluorescence in situ hybridization in radiation cytogenetic biodosimetry and population monitoring // *OBM Genetics*. 2018. V. 2. № 4. <https://doi.org/10.21926/obm.genet.1804042>
3. Beaton-Green L.A., Barr T., Ainsbury E.A., Wilkins R.C. Retrospective biodosimetry of an occupational overexposure-case study // *Radiat. Prot. Dosim.* 2016. V. 172. № 1–3. P. 254–259. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncw179>
4. 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 ^{60}Co γ -rays // *Radiat. Environ. Biophys.* 2009. V. 48. № 1. P. 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00411-008-0203-y>
5. Cho M.S., Lee J.K., Bae K.S. et al. Retrospective biodosimetry using translocation frequency in a stable cell of occupationally exposed to ionizing radiation // *J. Radiat. Res.* 2015. V. 56. № 4. P. 709–716. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrv028>
6. Ainsbury E.A., Bakhanova E., Barquinero J.F. et al. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures // *Radiat. Prot. Dosim.* 2011. V. 147. № 4. P. 573–592. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq499>
7. Lloyd D.C., Moquet J.E., Oram S. et al. Accidental intake of tritiated water: A cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction // *Int. J.*

- Radiat. Biol. 1998. V. 73. № 5. P. 543–547.
<https://doi.org/10.1080/095530098142095>
8. Grégoire E., Roy L., Buard V. et al. Twenty years of FISH-based translocation analysis for retrospective ionizing radiation biodosimetry // *Int. J. Radiat. Biol.* 2018. V. 94. № 3. P. 248–258.
<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1427903>
 9. Lucas J.N., Deng W. Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH // *Radiat. Prot. Dosim.* 2000. V. 88. № 1. P. 77–86.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a033024>
 10. Liu Q.-J., Lu X., Zhao X.-T. et al. Assessment of retrospective dose estimation, with fluorescence in situ hybridization (FISH), of six victims previously exposed to accidental ionizing radiation // *Mutat. Res. / Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis.* 2014. V. 759. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.07.016>
 11. Sorokine-Durm I., Durand V., Delbos M. et al. A french view on FISH painting as a biodosimeter // *Radiat. Prot. Dosim.* 2000. V. 88. № 1. P. 35–44.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a033017>
 12. Popp S., Cremer T. Development of a biological dosimeter for translocation scoring based on two-color fluorescence in situ hybridization of chromosome subsets // *J. Radiat. Res.* 1992. V. 33. (Suppl_1). P. 61–70.
https://doi.org/10.1269/jrr.33.Suppl_1.61
 13. Tanaka K., Popp S., Fischer C. et al. Chromosome aberration analysis in atomic bomb survivors and Thorotrast patients using two- and three-colour chromosome painting of chromosomal subsets // *Int. J. Radiat. Biol.* 1996. V. 70. № 1. P. 95–108.
 14. Sommer S., Buraczewska I., Wójciszewska M. et al. The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors // *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. V. 81. № 10. P. 741–749.
<https://doi.org/10.1080/09553000500499381>
 15. Distel L., Keller U., Neubauer S. Three-color FISH for the detection of individual radiosensitivity // *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide* / Ed. T. Liehr. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 231–241.
 16. 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>
 17. Нугис В.Ю., Снигирева 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* // *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2020. V. 65. № 5. P. 12–20. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20>
 18. Serakinci N., Kolvraa S. Molecular cytogenetic applications in diagnostics and research: an overview // *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide* / Ed. T. Liehr. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 3–22.
 19. Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K. et al. Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridization // *Int. J. Radiat. Biol.* 1997. V. 71. № 1. P. 35–39.
<https://doi.org/10.1080/095530097144391>
 20. Wahab M.A., Nickless E.M., Najar-M’Kacher R. et al. Elevated chromosome translocation frequencies in New Zealand nuclear test veterans // *Cytogenet. Genome Res.* 2008. V. 121. № 2. P. 79–87.
<https://doi.org/10.1159/000125832>
 21. Дмитриев П.В., Васецкий Е.С. Анализ теломерной ДНК: современные подходы и методы // *Онтогенез.* 2009. Т. 40. № 3. С. 163–184. [Dmitriev P.V., Vasetzky E.S. Analysis of telomeric DNA: Current approaches and methods // *Ontogenez.* 2009. V. 40. № 3. P. 163–184. (In Russ.)]
 22. Boei J.J.W.A., Natarajan A.T. Combined use of a chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations in mouse splenocytes // *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. V. 73. № 2. P. 125–133.
<https://doi.org/10.1080/095530098142491>
 23. Wu H., George K., Yang T.C. Estimate of true incomplete exchanges using fluorescence *in situ* hybridization with telomere probes // *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. V. 73. № 5. P. 521–527.
<https://doi.org/10.1080/095530098142068>
 24. Fomina J., Darroudi F., Boei J.J.W.A., Natarajan A.T. Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe // *Int. J. Radiat. Biol.* 2000. V. 76. № 6. P. 807–813.
<https://doi.org/10.1080/09553000050028968>
 25. Fomina J., Darroudi F., Natarajan A.T. Accurate detection of true incomplete exchanges in human lymphocytes exposed to neutron radiation using chromosome painting in combination with a telomeric PNA probe // *Int. J. Radiat. Biol.* 2001. V. 77. № 12. P. 1175–1183.
<https://doi.org/10.1080/09553000110083951>
 26. 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)
 27. 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)
 28. Нугис В.Ю., Севанькаев А.В., Хвостунов И.К. и др. Результаты 25-летнего цитогенетического обследования лиц, подвергшихся облучению в различных дозах при аварии на Чернобыльской АЭС // *Радиац. 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.)]
29. *Lingholm C., Tekkel M., Veidebaum T. et al.* Persistence of translocations after accident exposure to ionizing radiation // *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. V. 74. № 5. P. 565–571.
<https://doi.org/10.1080/095530098141140>
 30. *Lindholm C., Romm H., Stephan G. et al.* Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia // *Int. J. Radiat. Biol.* 2002. V. 78. №10. P. 883–890.
<https://doi.org/10.1080/09553000210155888>
 31. *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>
 32. *Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F. et al.* Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry application // *Radiat. Prot. Dosim.* 2005. V. 113. № 4. P. 396–402.
<https://doi.org/10.1093/rpd/nch452>
 33. *Salassidis K., Schmid E., Peter R.U. et al.* Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl nuclear power plant accident // *Mutat. Res.* 1994. V. 311. № 1. P. 39–48.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90071-X)
 34. *Урбах В.Ю.* Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 415 с. [*Urbah V.Yu.* Biometricheskiye metodi. Moskva: Nauka, 1964. 415 p. (In Russ.)]
 35. *Tucker J.D.* Reflections on the development and application of FISH whole chromosome painting // *Mutat. Res./Reviews in Mutat. Res.* 2015. V. 763. P. 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.006>
 36. *Tucker J.D.* Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry // *Mutat. Res./Reviews in Mutat. Res.* 2008. V. 659. № 3. P. 211–220.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.04.001>
 37. *Pouzoulet F., Roch-Lefevre S., Giraudet A.L. et al.* Monitoring translocations by m-FISH and three-color FISH painting techniques: a study of two radiotherapy patients // *J. Radiat. Res.* 2007. V. 48. № 5. P. 425–434.
<https://doi.org/10.1269/jrr.07013>
 38. *Ramadhani D., Purnami S., Yoshida M.* Comparison of radiosensitivity of human chromosomes 1, 2 and 4 from one healthy donor // *Atom Indonesia*. 2006. V. 42. № 2. P. 71–77.
<https://doi.org/10.17146/aij.2016.505>
 39. *Sommer S., Buraczewska I., Wojewodzka M. et al.* The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors // *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. V. 81. № 10. P. 741–749.
<https://doi.org/10.1080/09553000500499381>

Analysis Peripheral Blood Lymphocytes Cultures of Patient In long Terms after Emergency Irradiation with the Help of Three-color FISH Method

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

^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*

The results of cytogenetic analysis using mainly three-color FISH-staining of chromosome peripheral blood lymphocytes of one patient are presented in this paper. This patient was subjected to irradiation as a result of the accident at the Chernobyl nuclear power plant. The initial dose estimated by the dicentrics frequency was 3.2 Gy. The material was obtained in the total time interval of 9053–12554 days (24.8–34.4 years) after radiation exposure. The sets of DNA probes to {1, 4, 12} and {2, 3, 8} pairs of chromosomes were used, but not always together in all times. Total genomic frequency of complete and incomplete translocations was not statistically significantly changed for the entire period of observation. Retrospective dose estimates were produced according to the previously obtained in vitro dependences of the dose-effect. Dose values were located in the ranges from 1.98 to 2.44 Gy and from 2.14 to 2.67 Gy when analyzing of metaphases of all cells and only stable cells, respectively. The problem of taking into account of the presence of cell clones with chromosomal translocations is discussed.

Keywords: peripheral blood lymphocyte culture, acute irradiation, tricolor FISH method, translocations, retrospective assessment of radiation dose