

DOI: 10.33266/2782-6430-2024-4-40-44

В.Ю. Нугис, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, М.Г. Козлова, И.А. Галстян, Е.Е. Ломоносова
**ТРАНСЛОКАЦИИ ХРОМОСОМ В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТКИ
В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ АВАРИЙНОГО ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Нугис Владимир Юрьевич: nugisvju@list.ru

Резюме

Цель: Сравнить частоты транслокаций, выявленных с помощью одноцветного и трёхцветного FISH-окрашивания в отдалённые сроки (24 года) после локального переоблучения (более 100 Гр) пациентки в ходе лучевой терапии по поводу рака молочной железы.

Материал и методы: Материалом для цитогенетического исследования служили культуры лимфоцитов венозной крови данной пациентки. Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов хромосом осуществляли с помощью вариантов стандартных методик. Хромосомы окрашивали отдельно одноцветными или трёхцветными ДНК-зондами для 1, 4 и 12 пар. В обоих случаях было проанализировано по 1000 метафаз.

Результаты: В настоящем исследовании при применении одноцветного FISH-метода частота выявленных реципрокных транслокаций составила 0,5 на 100 проанализированных клеток, в то время как при трёхцветном окрашивании их было в 2.2 раза больше (1,0 на 100 метафаз). При использовании имевшейся линейно-квадратичной дозовой зависимости оценка средней дозы на всё тело составила в 0,30 Гр, что является следствием локального характера радиационного поражения, гибели лимфоцитов в зоне высокодозового радиационного поражения и явной невозможности их деления.

Выводы: Изучение частоты хромосомных транслокаций в отдалённые сроки после локального переоблучения в ходе терапии у больной по поводу рака молочной железы с помощью трёхцветного FISH-анализа оказалось более чувствительным методом в сравнении с одноцветным вариантом окрашивания.

Ключевые слова: культура лимфоцитов, периферическая кровь, FISH-метод, транслокация, переоблучение

Для цитирования: Нугис В.Ю., Астрелина Т.А., Никитина В.А., Козлова М.Г., Галстян И.А., Ломоносова Е.Е. Транслокации хромосом в лимфоцитах пациентки в отдалённые сроки после аварийного локального облучения // Клинический вестник ФМБЦ им. А.И. Бурназяна 2024. №4. С. 40–44. DOI: 10.33266/2782-6430-2024-4-40-44

DOI: 10.33266/2782-6430-2024-4-40-44

V.Yu. Nugis, T.A. Astrelina, V.A. Nikitina, M.G. Kozlova, I.A. Galstyan, E.E. Lomonosova²
**Chromosomal Translocations in Patient's Lymphocytes in the Long
Term after Accidental Local Irradiation)**

International Office, State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center
of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Contact person: Nugis Vladimir Yur'evich: nugisvju@list.ru

Abstract

Objective: to compare the frequencies of translocations detected by one-color and three-color FISH painting in the long term (24 years) after local over-irradiation (more than 100 Gy) of a patient during radiation therapy for breast cancer.

Material and methods: The material for the cytogenetical study were the cultures of venous blood lymphocytes of this patient. Cultivation of lymphocytes and preparation of chromosome preparations were carried out using variants of standard methods. Chromosomes were stained separately with one-color or three-color DNA probes for 1, 4 and 12 pairs. In both cases, 1000 metaphases were analyzed.

Results: In the present study, when using the one-color FISH-method, the frequency of detected reciprocal translocations was 0.5 per 100 analyzed cells, while with tricolor painting they were 2.2 times higher (1.0 per 100 metaphases). When using the available linear-quadratic dose dependence, the average dose to the whole body was estimated at 0.28 Gy, which is a consequence of the local nature of radiation damage, the death of lymphocytes in the zone of high-dose radiation damage and the obvious impossibility of their division.

Conclusion: The study of the frequency of chromosomal translocations in the long term after local overexposure during therapy in a patient for breast cancer using a three-color FISH-analysis is a more sensitive method in comparison with a one-color variant of FISH-painting.

Keywords: peripheral blood, lymphocyte culture, FISH-method, translocation, overirradiation

For citation: Nugis VYu, Astrelina TA, Nikitina VA, Kozlova MG, Galstyan IA, Lomonosova EE. Chromosomal Translocations in Patient's Lymphocytes in the Long Term after Accidental Local Irradiation . A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center Clinical Bulletin. 2024.4:40-44. (In Russian) DOI: 10.33266/2782-6430-2024-4-40-44

Введение

В настоящее время для цитогенетической оценки дозы в отдалённые сроки после облучения рекомендуется использовать методику FISH-окрашивания хромосом культивируемых лимфоцитов периферической крови [1]. При этом показателем величины перенесенного радиационного воздействия служит частота реципрокных транслокаций, относящихся к стабильному (во времени) типу перестроек хромосом. Как и оценку доз по средним частотам дицентриков (нестабильный тип аберраций хромосом) в ближайшие сроки после облучения, ретроспективную оценку доз по средним частотам транслокаций обычно производят по кривым доза-эффект, полученным после радиационной экспозиции венозной крови здоровых доноров *in vitro*. При этом основным вариантом используемого цитогенетического метода является одноцветное FISH-окрашивание (наиболее часто) трёх пар крупных хромосом, позволяющее регистрировать обмены только между FISH- и контрокрашенными парами хромосом. С помощью, так называемого, трёхцветного FISH-метода можно учитывать перестройки и между самими этими тремя wybranными парами хромосом [2, 3]. Также чаще всего в случаях внешнего облучения речь идёт о его тотальном, а не локальном, характере воздействия. Поэтому в настоящей работе была поставлена цель сравнить частоты хромосомных аберраций, выявленных с помощью одноцветного и трёхцветного FISH-окрашивания в отдалённые сроки после локального переоблучения пациентки в ходе лучевой терапии по поводу рака молочной железы.

Материал и методы

Материалом для данного цитогенетического исследования послужили 48-часовые культуры лимфоцитов периферической крови, полученной из кубитальной вены пациентки (1953 г. рождения) через 24 года после аварийного локального радиационного воздействия в ходе терапевтического облучения по поводу рака левой груди. Описание данного случая приведено в работе [4]. Ниже дано его краткое изложение.

Пациентка К. (1953 г. рождения), медсестра, в возрасте 42 лет поступила в онкологическое отделение с раком молочной железы слева ($T_1N_0M_0$, 1 степень). В рамках намеченного лечения была выполнена секторальная резекция указанной молочной железы. На основании гистологического исследования был поставлен диагноз инфильтративного долькового рака, в связи с чем был начат курс лучевой терапии на линейном ускорителе электронов на оставшуюся часть молочной железы (по 2 Гр каждый день). Во время очередного сеанса (23.02.1996 г., суммарная доза к этому моменту составила 10 Гр) произошло аварийное переоблучение с последующей яркой гиперемией области радиационного поражения (под лучом), жжением и чувством распирания в левой половине грудной клетки и левой молочной железе. Отсутствие латентного пе-

риода свидетельствовало об очень высокой дозе облучения (более 100 Гр). Средняя доза облучения на всё тело по данным классического цитогенетического анализа (частота дицентриков) культуры лимфоцитов периферической крови составила 0,3 Гр. На передней поверхности левой половины грудной клетки и левой молочной железы развилось местное лучевое поражение крайне тяжёлой степени. Далее наблюдалось нарастание патологических явлений: с 7 суток после облучения усилился болевой синдром; с 11 суток было отмечено увеличение отека молочной железы; с 14 суток появились эрозивные поверхности в подмышечной области слева, в области рукоятки грудины; на 25 сутки сформировалась зона некроза в верхней медиальной области левой молочной железы. С 1996 по 1997 гг. было произведено несколько некрэктомий мягких тканей, грудины, рёберных хрящей с закрытием дефектов трансплантированными кожно-мышечными лоскутами. Для борьбы с инфекциями проводилась антибиотикотерапия; для купирования анемии и гипопроотеинемии осуществлялись многократные гемотрансфузии. Также потребовалась медикаментозная терапия в связи с развившимся миокардитом и пневмофиброзом. В настоящее время состояние пациентки достаточно удовлетворительно, хотя она и является инвалидом 2 группы.

Культуры лимфоцитов периферической крови и препараты хромосом готовили согласно используемым в лаборатории методикам, которые в целом аналогичны технологиям, предлагаемым в рекомендациях МАГАТЭ (2011 г.) [1]. При осуществлении одноцветного и трёхцветного FISH-окрашивания хромосом использовали соответствующие готовые наборы ДНК-зондов к парам целых хромосом №№ 1, 4 и 12 (контрокраситель — DAPI) фирмы «Meta-Systems» (Германия). При обработке и окраске препаратов хромосом следовали прилагаемыми к наборам фирменным инструкциям. Регистрацию метафаз и их цитогенетический анализ производили с помощью автоматизированной системы «Metafer4» фирмы «MetaSystems». Учитывались только метафазные клетки, имевшие полный набор FISH-меченных хромосом. Регистрировали все аберрации хромосомного типа, в образовании которых участвовали FISH-окрашенные структуры (транслокации, инсерции, дицентрики, кольца, парные фрагменты). Также учитывали только все транслокации без их разделения на полные — неполные (реципрокные — нереципрокные), что обусловлено данными о том, что на молекулярном уровне при переносе небольших участков хромосом неполнота обмена оказывается ложной вследствие ограниченности разрешающей способности FISH-метода [5].

Для сравнения частот метафаз с транслокациями в культурах лимфоцитов периферической крови у представителей контрольной популяции и у пациентки К. использовали метод χ^2 с поправкой Йейтса при критическом уровне значимости, равном 0,05. Как и регрессионный анализ, статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ Statistica 6.

Результаты

В таблице представлены результаты цитогенетического анализа с помощью одноцветного и трёхцветного FISH-окрашивания хромосом лимфоцитов периферической крови пациентки К. через 24 года после случайного локального переоблучения.

При более подробном рассмотрении обнаруженных aberrантных клеток необходимо отметить следующее. При использовании одноцветного FISH-метода были обнаружены 5 метафаз с одиночными полными транслокациями и одна метафаза с ацентрическим кольцом (нестабильная aberrация), сформировавшимся в результате произошедшей интерстициальной делеции в длинном плече 4 хромосомы. При трёхцветном окрашивании также наблюдались клетки с одиночными транслокациями, но помимо них в одной метафазе транслокация сопровождалась двумя FISH-окрашенными парными фрагментами. Особый интерес представляла метафаза с множественными перестройками по одной из 1 хромосом, отдельные участки которой участвовали в образовании 2 транслокаций, одной инсерции, дицентрика и парного фрагмента. При использовании одноцветного варианта FISH-методики не все эти перестройки могли бы быть зарегистрированы.

Обсуждение

При использовании одноцветного FISH-метода для сравнения полученных данных с результатами цитогенетического анализа лиц, принадлежащих к контрольным контингентам, приведенными в работе [6], необходим перерасчёт обнаруженного числа транслокаций в их частоту во всём геноме. Для этого была использована следующая формула из основополагающей работы [7]:

$$F_G = F_P / 2,05 \times f_p \times (1 - f_p)$$

где F_G — геномная частота транслокаций, F_P — наблюдаемая частота транслокаций с участием флуоресцентно-окрашенных хромосом, f_p — доля генома по содержанию ДНК, которую составляют флуоресцентно-окрашенные хромосомы. По данным, приведенным в руководстве МАГАТЭ [1], для 1, 4 и 12 пар последняя величина составляет 0,19. Таким образом, в нашем случае

$$F_G = 3,17 \times F_P.$$

Аналогично для пациентки К. можно вычислить количество геном-эквивалентных клеток для найденного числа транслокаций в просмотренном количестве метафаз:

$$N_G = 2,05 \times f_p \times (1 - f_p) \times N_P$$

где N_G — количество геном-эквивалентных клеток, N_P — количество проанализированных метафаз. Таким образом, в нашем случае

$$N_G = 0,315495 \times N_P = 0,315495 \times 1000 \approx 315 (1)$$

Соответствующий возрастной контроль (60-69 лет) для данной пациентки К. составляет 328 транслокаций на 32547 геном-эквивалентных клеток [6].

Однако в настоящее время ещё не накоплен достаточный материал по спонтанному уровню транслокаций при использовании трёхцветного FISH-метода. В то же время в работе [8] дан математический аппарат, позволяющий оценить теоретическую частоту транслокаций при применении трёхцветного FISH-окрашивания, исходя из наблюдаемой частоты этих перестроек в препаратах с окраской хромосом в соответствии с одноцветным вариантом FISH-метода. Не приводя всех вычислений на основании формул, приведенных в данной работе, отметим, что в их основе также лежат сведения об относительном содержании ДНК в отдельных хромосомах. В результате стало ясным, что для сравнений возрастной контрольной и наблюдаемой частот, необходимо частоту транслокаций, обнаруженных в работе [6] увеличить в 1,07 раза, т.е. для возрастной группы 60-69 лет следует считать, что при использовании трёхцветного FISH-метода в контрольной популяции была бы найдена 351 транслокация на 32547 геном-эквивалентных клеток.

На рис. 1 представлена фотография метафазы после однократного FISH-окрашивания с транслокацией между 1-ой и контрокрашенной хромосомами. После трёхцветного FISH-окрашивания метафаза с транслокацией между 4-ой и контрокрашенной хромосомами показана на рис. 2.

Из таблицы видно, что частоты aberrантных клеток и aberrаций различного вида в целом были не очень большими, хотя основную их часть составляли транслокации. Это может быть вызвано разными факторами: элиминация клеток, несущих нестабильные aberrации, в том числе совместно

Таблица

Результаты цитогенетического анализа с помощью одноцветного и трёхцветного FISH-методов окрашивания хромосом лимфоцитов периферической крови пациентки К. через 24 года после случайного локального переоблучения при использовании ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом

Results of cytogenetical analysis using one-color and three-color FISH methods of chromosome staining of peripheral blood lymphocytes of patient K. 24 years after accidental local overexposure using DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes

Метод FISH	Число проанализированных метафаз	Процент aberrантных клеток	Процент клеток с транслокациями	Частота aberrаций хромосомного типа (на 100 клеток)				
				транслокации	инсерции	дицентрики	парные фрагменты	ацентрические кольца
Одноцветный	1000	0,6	0,5	0,5	0	0	0	0,1
Трёхцветный	1000	1,0	1,0	1,1	0,1	0,1	0,3	0

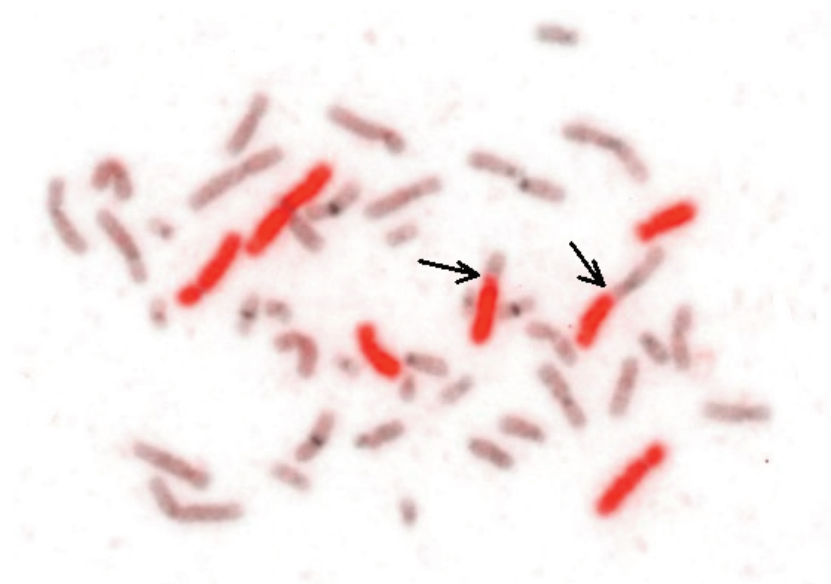


Рис. 1. Одноцветное FISH-окрашивание: метафаза с транслокацией между 1-ой и контрокрашенной хромосомами (точки разрывов показаны стрелками)

Fig. 1. One-color FISH staining: metaphase with translocation between the 1st and counter-stained chromosomes (breakpoints are shown by arrows)

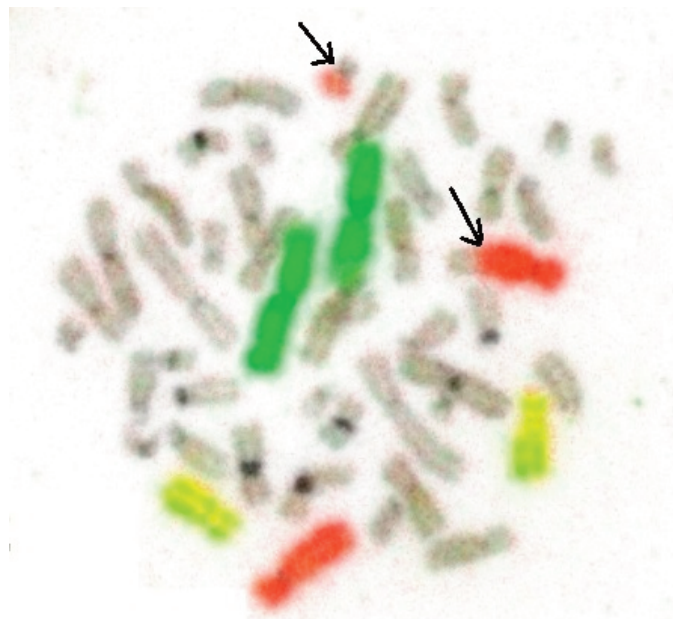


Рис. 2. Трёхцветное FISH-окрашивание: метафаза с транслокацией между 4-ой и контрокрашенной хромосомами (точки разрывов показаны стрелками)

Fig. 2. Three-color FISH staining: metaphase with translocation between the 4th and counter-stained chromosomes (breakpoints are shown by arrows)

со стабильными; исходная локальность острого аварийного облучения; высокая доза радиационного поражения, приведшая к существенному повреждению и/или гибели лимфоцитов и соответствующая невозможность для них вступить в митоз в культуре; многочисленные некрэктомии повреждённых тканей.

При пересчёте обнаруженной с помощью одноцветного FISH-метода частоты транслокаций на геномную частоту она составила 1,585 на 100 проанализированных клеток. Вычисленное количество геном-эквивалентных клеток, как указывалось выше равнялось примерно 315. В итоге при использовании метода χ^2 с поправкой Йейтса обнаружен-

ное число клеток с транслокациями статистически значимо не отличалось от литературного контрольного уровня для данного возраста: $p = 0,4597$.

При трёхцветном FISH-окрашивании было выявлено в 2,2 раза больше транслокаций по сравнению с одноцветным FISH-методом. Для пересчёта просмотренного числа метафаз в их геном-эквивалентное количество по аналогии с формулой (1) было применено уравнение, образованное из зависимости, которая дана в работе [8]:

$$N_G = 0,394 \times N_P = 0,394 \times 1000 = 394. \quad (2)$$

где N_G — количество геном-эквивалентных клеток, N_P — количество проанализированных метафаз при использовании трёхцветного FISH-метода.

Таким образом, при пересчёте обнаруженной с помощью трёхцветного FISH-метода частоты транслокаций на геномную частоту последняя составила 2,79 на 100 проанализированных клеток.

На основе метода χ^2 с поправкой Йейтса было показано, что обнаруженное количество клеток с транслокациями статистически существенно превышало теоретическую спонтанную частоту, рассчитанную по данным, приведенным в работе [6]: $p = 0,0116$. Это позволяет оценить среднюю дозу на всё тело по линейно-квадратичной зависимости, для чего была использована следующая калибровочная кривая, построенная с помощью регрессионного анализа данных, приведенных в работе [3] по результатам гамма-облучения крови трех доноров *in vitro*:

$$Y = 1,0 + 3,96 \times D + 6,58 \times D^2 \quad (3),$$

где Y – частота транслокаций на 100 геном-эквивалентных клеток, D – доза, Гр. (3)

Решение уравнения (3) даёт дозу, равную 0,30 Гр, что практически совпадает с первоначальной оценкой дозы 0,3 Гр по дицентрам. Если бы это была доза тотального облучения, то её надо было бы расценить, как показатель доклинического радиационного поражения (ОЛБ не развивается). Как указывалось выше, такая небольшая величина дозы обусловлена локальным характером радиа-

ционного поражения. При этом сама крайне высокая местная доза (100 Гр), по-видимому, обусловила массовую гибель лимфоцитов, находившихся непосредственно в месте поражения «под лучом». Соответственно, они и не могли дать потомство. На наличие области, подвергшейся облучению в гораздо более высокой дозе, чем 0,25-0,30 Гр, указывает описанная выше клетка с несколькими различными абберациями хромосом. Клетки этого типа не встречаются в диапазоне доз такого в целом небольшого уровня. Также именно трёхцветный FISH-метод позволяет выявлять не только простые, но и более сложные межхромосомные обмены.

5. Заключение

Как видно из результатов, трёхцветное FISH-окрашивание выявило большее число транслокаций по сравнению с одноцветным. Их частота значительно превышала контрольный уровень. Таким образом, изучение частоты хромосомных транслокаций в отдалённые сроки после локального переоблучения в ходе терапии у больной по поводу рака молочной железы с помощью трёхцветного FISH-анализа оказалось более чувствительным методом по сравнению с одноцветным вариантом методики.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna, IAEA, 2011. 229 p.
2. Suto Y., Akiyama M., Noda T., Hirai M. Construction of a Cytogenetic Dose-Response Curve for Low-Dose Range Gamma-Irradiation in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Three-Color FISH. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environmental Mutagenesis* 2015;794:32–38. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.002.
3. Нугис В.Ю., Снигирёва Г.П., Ломоносова Е.Е., Козлова М.Г., Никитина В.А. Трёхцветный FISH-метод: кривые доза-эффект для транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови после гамма-облучения *in vitro* // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2020. Т.65. №5. С.12-20. [Nugis V.Yu., Snigireva G.P., Lomonosova E.E., Kozlova M.G., Nikitina V.A. Three-color FISH Method: Dose-Effect Curves for Translocations in Peripheral Blood Lymphocyte Cultures after Gamma Irradiation *in vitro*. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost'* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65;5:12-20 (In Russ.)] DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20.
4. Надежина Н.М., Галстян И.А. Лечение местных лучевых поражений. М.: ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2013. 99 с. [Nadezhina N.M., Galstyan I.A. *Lecheniye Mestnykh Luchevykh Porazheniy* = Treatment of Local Radiation Injuries. Moscow, FMBTS im. A.I. Burnazyana FMBA Rossii Publ., 2013. 99 p. (In Russ.)].
5. Boei J.J.W.A., Natarajan A.T. Combined Use of a Chromosome Painting and Telomere Detection to Analyse Radiation-Induced Chromosomal Aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998;73;2:125–133. DOI: 10.1080/095530098142491.
6. Whitehouse C.A., Edwards A.A., Tawn E.J., Stephan G., Oestreicher U., Moquet J.E., et al. Translocation Yields in Peripheral Blood Lymphocytes from Control Populations. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005;81;2:139-145. DOI: 10.1080/09553000500103082.
7. Lucas J.N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., et al. Rapid Translocation Frequency Analysis in Human Decades after Exposure to Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992;62;1:53-63. DOI: 10.1080/09553009214551821.
8. Loucas B.D., Shuryak I., Cornforth M.N. Three-Color Chromosome Painting as Seen through the Eyes of mFISH: Another Look at Radiation-Induced Exchanges and their Conversion to Whole-Genome Equivalency. *Front. Oncol.* 2016;6:52. DOI: 10.3389/fonc.2016.00052.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 17.09.2024. **Принята к публикации:** 14.10.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study had no sponsorship.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 17.09.2024. **Accepted for publication:** 14.10.2024