

5. Allen J, Howell K. Microvascular imaging: Techniques and opportunities for clinical physiological measurements. *Physiol Meas* 2014; 35 (7): 91–141.
6. Datsenko AV, Fomina TV, Dyoshin IA, Kazmin VI. Investigation of the relationship between changes in thermographic and flowmetric parameters of skin peripheral hemodynamics in laboratory rats. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2017; 13 (4): 901–7. Russian (Даценко А. В., Фомина Т. В., Дёшин И. А., Казьмин В. И. Исследование взаимосвязи изменений термографических и флоуметрических показателей состояния кожной периферической гемодинамики у лабораторных крыс. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2017; 13 (4): 901–7).
7. Lahiri BB, Bagavathiappan S, Jayakumar T, Philip J. Medical applications of infrared thermography: A review. *Infrared Physics & Technology* 2012; 55 (4): 221–35.
8. Kozhevnikova IS, Pankov MN, Gribov AV, et al. The use of infrared thermography in modern medicine (Literature review). *Human Ecology* 2017; (2): 39–46. Russian (Кожевникова И. С., Панков М. Н., Грибов А. В. и др. Применение инфракрасной термографии в современной медицине (обзор литературы). *Экология человека* 2017; (2): 39–46).
9. Kumar US, Sudharsan NM. Non invasive detection of abnormalities using thermal image. *Int J Pharm Technol* 2017; 9 (2): 29524–32.
10. Potekhina YuP, Golovanova MV. The reasons of the change of local body temperature. *Medical Almanac* 2010; 11 (2): 297–8. Russian (Потехина Ю. П., Голованова М. В. Причины изменения локальной температуры тела. *Медицинский альманах* 2010; 11 (2): 297–8).
11. Konoplev VA, Gorokhov VE, Bokarev AV, Kovalev SP. Infrared thermography of the pathology of the distal part of the limbs of household and agricultural animals. *International bulletin of Veterinary Medicine* 2018; (1): 93–7. Russian (Коноплев В. А., Горохов В. Е., Бокарев А. В. Инфракрасная термография патологии дистальной части конечностей домашних и сельскохозяйственных животных. *Международный вестник ветеринарии* 2018; (1): 93–7).
12. Rekant SI, Lyons MA, Pacheco JM, et al. Veterinary applications of infrared thermography. *Am J Vet Res* 2016; 77 (1): 98–107.
13. Stewart M, Webstert JR, Schaefer AL, et al. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Anim Welfare* 2005; 14 (4): 319–25.
14. Vianna DM, Carrive P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 2005; 21 (9): 2505–12.
15. Lecorps B, Rödel HG, Féron C. Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. *Physiol Behav* 2016; 157: 209–16.
16. Cheung BM, Chan LS, Lauder IJ, Kumana CR. Detection of body temperature with infrared thermography: accuracy in detection of fever. *Hong Kong Med J* 2012; 18 (3): 31–4.
17. Sagaidachnyi AA, Fomin AV. Analysis of time derivative of the temperature response of fingers on the brachial occlusion and its relationship with hemodynamic parameters. *Regional blood circulation and microcirculation* 2017; 16 (3): 31–40. Russian (Сагайдачный А. А., Фомин А. В. Анализ временной производной температурной реакции пальцев рук на плечевую окклюзию и ее взаимосвязь с параметрами гемодинамики. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2017; 16 (3): 31–40).
18. DiLeo T, Roberge RJ, Kim JH. Effect of wearing an N95 filtering facepiece respirator on superomedial orbital infrared indirect brain temperature measurements. *J Clin Monit Comput* 2017; 31 (1): 67–73.
19. Zębala M, Kaczmarska K, Bogucki J, et al. Intraoperative assessment of cerebral blood flow changes in normal and pathological brain tissue using an infrared camera. *Quantitative Infrared Thermography Journal* 2018; 15 (2): 240–51.
20. Khugaeva VK. Legends and real pattern of microcirculation. *Pathogenesis* 2013; 11 (2): 32–41. Russian (Хугаева В. К. Легенды и реальные закономерности микроциркуляции. *Патогенез* 2013; 11 (2): 32–41).

УДК [57+61]:575.224.232:616–00

Оригинальная статья

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРЕХЦВЕТНОГО FISH-МЕТОДА ОКРАСКИ ХРОМОСОМ ПРИ АНАЛИЗЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Е. И. Добровольская — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, врач-генетик специализированной лаборатории цитологии, генетики и иммунологии; **В. Ю. Нугис** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, заведующий лабораторией радиационной гематологии и цитогенетики, доктор биологических наук; **Г. П. Снигирева** — ФГБУ «Российский научный центр рентгено-радиологии» Минздрава России, заведующая лабораторией молекулярной биологии и цитогенетики, доктор биологических наук; **М. Г. Козлова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, научный сотрудник лаборатории радиационной гематологии и цитогенетики; **В. А. Никитина** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, ведущий научный сотрудник лаборатории радиационной гематологии и цитогенетики, биолог Криобанка Центра биомедицинских технологий, кандидат медицинских наук.

USE OF THE TRICOLOR FISH-PAINTING METHOD OF CHROMOSOMES FOR THE ANALYSIS OF RADIATION-INDUCED CHROMOSOMAL ABERRATIONS: A PILOT STUDY

E. I. Dobrovolskaya — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Doctor-geneticist of Specialized Laboratory of Cytology, Genetics and Immunology; **V. Yu. Nugis** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of Laboratory of Radiation Hematology and Cytogenetics, DSc; **G. P. Snigiryova** — Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Head of Laboratory of Molecular Biology and Cytogenetics, DSc; **M. G. Kozlova** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Researcher of Laboratory of Radiation Hematology and Cytogenetics; **V. A. Nikitina** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Leading Researcher of Laboratory of Radiation Hematology and Cytogenetics, Biologist of Specialized Laboratory of Cytology, Genetics and Immunology of Center for Biomedical Technologies, PhD.

Дата поступления — 25.07.19 г.

Дата принятия в печать — 05.12.2019 г.

Добровольская Е. И., Нугис В. Ю., Снигирева Г. П., Козлова М. Г., Никитина В. А. Использование трехцветного FISH-метода окраски хромосом при анализе радиационно-индуцированных aberrаций хромосом: пилотное исследование. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2019; 15 (4): 982–985.

Цель: сравнить частоты радиационно-индуцированных транслокаций, выявляемых с помощью трехцветного FISH-метода, при исследовании различных наборов ДНК-зондов. **Материал и методы.** Материалом для цитогенетического исследования послужила венозная кровь одного здорового донора мужского пола, подвергнутая гамма-облучению *in vitro* в дозах 0,1–3,0 Гр. Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов хромосом осуществляли с помощью вариантов стандартных методик. Хромосомы окрашивали отдельно трехцветными ДНК-зондами: для 1, 4 и 12 пар и для 2, 3 и 8 пар. **Результаты.** Возрастание дозы вызывало увеличение частоты транслокаций при использовании обоих наборов ДНК-зондов. При применении любого из них частоты FISH-регистрируемых транслокаций во всех клетках (стабильных и нестабильных) существенно не отличались от аналогичной величины только в стабильных клетках. Сравнение частот транслокаций, выявляемых с помощью ДНК-зондов разных видов, также показало отсутствие статистически существенных различий как во всех, так и в стабильных клетках. **Заключение.** Использование двух выбранных наборов ДНК-зондов продемонстрировало отсутствие значимых различий между ними по наблюдаемым частотам индуцированных радиацией транслокаций хромосом.

Ключевые слова: культура лимфоцитов периферической крови, FISH-метод, транслокация, облучение.

Dobrovolskaya EI, Nugis VYu, Snigiryova GP, Kozlova MG, Nikitina VA. Use of the tricolor FISH-painting method of chromosomes for the analysis of radiation-induced chromosomal aberrations: a pilot study. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2019; 15 (4): 982–985.

Purpose: to compare the frequency of radiation-induced translocations detected by three-color FISH-method using different sets of DNA probes. **Material and Methods.** The material for the cytogenetic study was venous blood of one healthy male donor subjected to *in vitro* gamma-radiation in doses of 0.1–3.0 Gy. Cultivation of lymphocytes and preparation of chromosome specimens were carried out using variants of standard techniques. Chromosomes were stained separately with three-color DNA probes: for 1, 4 and 12 pairs and for 2, 3 and 8 pairs. **Results.** The increase of dose produced frequency of translocations growth when using both sets of DNA probes. When using any of them, the frequencies of FISH-registered translocations in all cells (stable and unstable) did not differ significantly from the same value only in stable cells. A comparison of the translocation frequencies detected using DNA probes of different species also showed absence of statistically significant differences in both all and stable cells. **Conclusion.** The use of two selected sets of DNA probes demonstrated absence of significant differences between them in the observed frequencies of radiation-induced chromosome translocations.

Key words: peripheral blood lymphocyte culture, FISH-method, translocation, irradiation.

Введение. Подсчет aberrаций хромосом с помощью их классической окраски в культурах лимфоцитов периферической крови является общепринятым методом биологической индикации дозы в ближайшие сроки после острого внешнего облучения в дозах, вызывающих развитие острой лучевой болезни, и основан на определении частоты дицентриков, которая имеет тенденцию к снижению с течением времени [1]. Для ретроспективной оценки дозы или ее индикации при пролонгированном/хроническом облучении рекомендуется использовать FISH-окрашивание хромосом [1], которое позволяет выявлять реципрокные транслокации, не представляющие механического препятствия для протекания митоза и относящиеся поэтому к стабильному (во времени) типу перестроек хромосом. Для оценки дозы по средней частоте дицентриков обычно используют кривые «доза — эффект», полученные по результатам облучения крови здоровых доноров *in vitro*. Аналогичным образом предложено поступать и для ретроспективной оценки дозы по частотам реципрокных транслокаций с помощью FISH-метода.

До настоящего времени основным для цитогенетической ретроспективной оценки дозы является одноцветный вариант FISH-методики с использованием комплементарных к ДНК хромосом ДНК-зондов с присоединенным каким-то одним флуорохромным красителем. При этом обычно выбирают хромосомы из групп А, В и С, так как они являются наиболее крупными в кариотипе человека. С другой стороны, исследователи, по-видимому, не хотят ограничиваться наибольшими хромосомами только из группы А, хотя в целом большинство исходит из гипотезы о зависимости вероятности вовлечения каждой данной хромосомы в перестройку только от количества содержащегося в ней ДНК. Однако было бы интересно и полезно узнать, насколько может повлиять

на чувствительность FISH-метода регистрация обменов не только между тремя выбранными FISH-окрашенными и контрольными хромосомами, но и между самими этими FISH-окрашенными хромосомами.

Цель: сравнить частоты радиационно-индуцированных транслокаций, выявляемых с помощью трехцветного FISH-метода, при использовании различных наборов ДНК-зондов.

Материал и методы. Материалом для данного первичного цитогенетического исследования послужила полученная из кубитальной вены кровь одного здорового донора мужского пола (возраст — 41 год). Радиационное воздействие производилось *in vitro* при комнатной температуре гамма-лучами ^{60}Co на терапевтической установке «Луч» в дозах 0,10; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 и 3,00 Гр (мощность дозы равнялась 0,5 Гр/мин). Одна проба осталась необлученной для регистрации контрольного уровня aberrаций хромосом. Облученная и необлученная кровь использована для постановки в стерильных условиях 50-часовых культур лимфоцитов периферической крови в соответствии с принятой в лаборатории методикой, которая в целом аналогична подходу, представленному в рекомендациях МАГАТЭ (2011) [1]. Препараты хромосом также готовили стандартным способом. При выполнении трехцветного FISH-метода окрашивания хромосом использовали готовые наборы ДНК-зондов к парам целых хромосом № 1, 4, 12 и № 2, 3, 8 (контркрастиль DAPI) фирмы MetaSystems. Следует отметить, что по суммарному относительному содержанию ДНК оба эти набора близки друг к другу. Доля ДНК в них по отношению к диплоидному набору хромосом у мужчин равняется 0,1917 и 0,1966 соответственно. При обработке и окраске препаратов хромосом руководствовались прилагаемой к набору фирменной инструкцией.

В настоящем первичном исследовании решили ограничиться сравнением выхода радиационно-ин-

Ответственный автор — Нугис Владимир Юрьевич
Тел.: +7 (925) 8463120
E-mail: nugisvju@list.ru

дуцированных транслокаций при использовании различных наборов ДНК-зондов и во всех (стабильных и неабберрантных) и нестабильных клетках, причем учитывали aberrации с участием как FISH-окрашенных, так и контрокрашенных хромосом. Для этого применен G-критерий знаков для двух связанных выборок при критическом уровне значимости, равном 0,05 (пакет статистических программ Statistica 6).

Результаты. В табл. 1 представлены результаты цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови выбранного здорового донора

при использовании трехцветного FISH-окрашивания с помощью ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом. Аналогичные данные приведены в табл. 2 для ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом. Показаны данные для aberrаций хромосом, в образовании которых участвовали FISH-окрашенные структуры.

Обсуждение. Наряду с ожидаемыми транслокациями между FISH- и контрокрашенными хромосомами и между разными FISH-окрашенными хромосомами при достаточно больших дозах (больше 1 Гр) встречались редкие и интересные находки в виде клеток с наблюдавшимся обменом дисталь-

Таблица 1

Результаты цитогенетического трехцветного FISH-анализа культур лимфоцитов периферической крови здорового донора в контроле и после гамма-облучения in vitro при использовании ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Число транслокаций		Частота транслокаций на 100 клеток		Частота инсерций на 100 клеток	Частота инверсий на 100 клеток	Частота дицентриков на 100 клеток	Частота центрических колец на 100 клеток	Частота ацентриков на 100 клеток	Частота транслокаций на 100 клеток на весь геном	
			полных	неполных	все клетки	стабильные клетки						все клетки	стабильные клетки
0	1018	1016	3	0	0,3	0,3	0	0	0	0	0,1	0,9	0,9
0,10	611	609	3	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0,2	1,4	1,4
0,15	366	362	2	0	0,6	0,6	0	0	0,3	0	0	1,6	1,6
0,25	668	661	6	0	0,9	0,9	0	0	0,3	0	0	2,6	2,7
0,35	636	634	8	1	1,4	1,4	0	0	0,2	0	0,6	4,1	4,2
0,50	1116	1107	14,5	0	1,3	1,3	0	0	0,2	0	0,4	3,8	3,8
0,75	511	498	20	2	4,3	4,2	0	0	0,8	0	0	12,6	12,4
1,00	969	915	42	2	4,5	4,6	0	0	2,2	0	0,8	13,3	13,4
1,50	442	416	33	3	8,1	8,4	0	0,2	1,1	0	0,9	23,8	24,6
2,00	372	300	36	1	10,0	8,3	0	0	5,1	0	3,8	29,1	24,4
3,00	428	236	106,5	3	25,6	23,1	0,2	0,2	15,2	1,2	13,1	74,9	67,6

Примечание: при определении стабильности клеток учитывали aberrации не только по FISH-окрашенным, но и по контрокрашенным хромосомам.

Таблица 2

Результаты цитогенетического трехцветного FISH-анализа культур лимфоцитов периферической крови здорового донора в контроле и после гамма-облучения in vitro при использовании ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Число транслокаций		Частота транслокаций на 100 клеток		Частота инсерций на 100 клеток	Частота инверсий на 100 клеток	Частота дицентриков на 100 клеток	Частота центрических колец на 100 клеток	Частота ацентриков на 100 клеток	Частота транслокаций на 100 клеток на весь геном	
			полных	неполных	все клетки	стабильные клетки						все клетки	стабильные клетки
0	175	174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,10	688	686	3	0	0,4	0,4	0	0	0	0	0,2	1,2	1,2
0,15	509	508	2	0	0,4	0,2	0	0	0	0	0,4	1,1	0,6
0,25	952	948	6	0	0,6	0,6	0	0,1	0,2	0	0	1,8	1,8
0,35	1005	1000	10	0	1,0	0,9	0	0	0,1	0	0,5	2,9	2,6
0,50	1093	1075	18	1	1,7	1,8	0,1	0	0,6	0	0,6	5,0	5,1
0,75	1100	1045	24	0	2,2	2,1	0	0	0,9	0,2	0,5	6,2	6,0
1,00	438	414	16	0	3,6	3,6	0	0	0,9	0	0,5	10,5	10,4
1,50	374	335	26	0	7,0	6,9	0	0	3,5	0	1,1	19,9	19,7
2,00	546	470	62,5	3	12,0	10,7	0	0,9	5,1	0,4	3,5	34,4	30,8
3,00	565	362	146	3	26,4	21,0	1,4	0,4	12,2	0,5	10,4	75,5	60,1

Примечание: при определении стабильности клеток учитывали aberrации не только по FISH-окрашенным, но и по контрокрашенным хромосомам.

ными участками между тремя хромосомами как бы «по кругу». Например, найдена метафаза, в которой часть хромосомы 3 присоединилась к хромосоме 8, часть хромосомы 8 присоединилась к конторкрашенной хромосоме, а часть конторкрашенной хромосомы присоединилась к 3-й хромосоме. В этом случае произошло три разрыва в трех хромосомах, что может быть зарегистрировано только при рассматриваемом трехцветном FISH-методе. Возникает вопрос: сколько же образуется в этом случае транслокаций? Действительно, при одной обычной транслокации происходит два разрыва в двух хромосомах, при двух независимых транслокациях — четыре разрыва в четырех хромосомах. Поэтому мы посчитали возможным обозначить обнаруженный феномен как 1,5 транслокации, хотя в статье [2] авторы предлагают считать, что имеется 2 транслокации. В связи с тем что мы приняли решение так учитывать данные взаимосвязанные транслокации, в табл. 1 и 2 имеются парадоксальные количества транслокаций в виде целого числа с половиной: $N,5$ (N — целое число).

Основное предположение, лежавшее в основе предложения использовать FISH-метод для ретроспективной оценки дозы, заключалось в стабильности их частоты во времени. Однако продолжительные цитогенетические наблюдения за лицами, пострадавшими в результате реальных радиационных аварий на Чернобыльской АЭС (1986 г.) [3] и в г. Гойянии, Бразилия (1987 г.) [4], показали, что данное первоначальное положение о сохранности индуцированных частот стабильных перестроек с течением времени после облучения оказалось соответствующим действительности только до уровня доз 0,8–2 Гр, хотя на практике в подавляющем большинстве случаев при необходимости осуществления ретроспективной оценки дозы этого, по-видимому, вполне достаточно.

В целом упомянутое снижение уровней реципрокных транслокаций при реальном наблюдении за облученными лицами по сравнению с ожидаемыми по результатам исходного определения частот дицентриков в ближайшие сроки после облучения обусловлено совместным нахождением стабильных и нестабильных aberrаций в одних и тех же клетках и их совместной элиминацией при репродуктивной гибели клеток из-за наличия нестабильных перестроек хромосом. Поэтому некоторые авторы предложили при ретроспективной оценке по FISH-методу подсчитывать перестройки хромосом только в стабильных клетках.

Проведенное на материале данной работы сравнение между собой частот транслокаций в стабильных и нестабильных клетках и при использовании разных наборов ДНК-зондов с использованием G-критерия знаков для двух связанных выборок позволило продемонстрировать следующее:

1. При применении любого из двух наборов ДНК-зондов частоты FISH-регистрируемых транслокаций

во всех (стабильных и нестабильных) клетках существенно не отличались от аналогичной величины только в стабильных клетках: $p=0,724$ и $0,131$ для 1, 4 и 12 и для 2, 3 и 8 пар хромосом соответственно.

2. При объединении всех данных независимо от выбранного набора ДНК-проб в диапазоне всех доз радиационного воздействия от 0,1 до 3,0 Гр частоты транслокаций во всех и стабильных клетках также значимо не различались друг от друга с $p=0,628$. Однако при сужении диапазона доз (0,75–3,0 Гр) уровень значимости снижался до $p=0,114$.

3. При сравнении частот транслокаций, выявляемых с помощью разных наборов ДНК зондов для 1, 4 и 12 и для 2, 3 и 8 пар хромосом, статистически существенные различия также отсутствовали как во всех, так и в стабильных клетках: $p=0,343$ и $0,114$ соответственно.

Проведенное исследование является только началом запланированной работы по построению зависимостей «доза — эффект» для частот транслокаций, выявляемых с помощью трехцветного FISH-метода. Ясно, что для получения статистически надежных зависимостей и выявления других связанных эффектов необходимо продолжение работы с использованием облученной *in vitro* крови других доноров.

Заключение. Использование двух выбранных наборов ДНК-зондов продемонстрировало отсутствие значимых различий между ними по наблюдаемым частотам индуцированных радиацией транслокаций хромосом.

Конфликт интересов не заявляется. Работа финансировалась из бюджета по теме НИР.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования — В.Ю. Нугис, Г.П. Снигирева; получение и обработка данных — Е.И. Добровольская, М.Г. Козлова, В.А. Никитина; анализ и интерпретация результатов, написание статьи — Е.И. Добровольская, В.Ю. Нугис; утверждение рукописи для публикации — В.Ю. Нугис.

References (Литература)

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: 32–8.
3. Sevankaev AV, Khvostunov IK, Mikhailova GF, et al. Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure. *Applied Radiation and Isotopes* 2000; 52 (5): 1149–52.
4. Natarajan AT, Santos SJ, Darroudi F, et al. Cesium-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization: Eight years follow up of the Goiania radiation accident victims. *Mutat Res* 1998; 400 (1): 299–312.