

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.32-35>

Анализ aberrаций числа копий ДНК в лимфоцитах крови работников атомной отрасли, подвергшихся внешнему радиационному воздействию

Исубакова Д.С.¹, Литвяков Н.В.^{1,2}, Цымбал О.С.¹, Усова Т.В.¹, Цыпленкова М.Ю.¹, Мильто И.В.^{1,3}, Тахауов Р.М.^{1,3}

1 – ФГБУН «Северский биофизический научный центр» Федерального медико-биологического агентства
636013, Томская обл., ЗАТО Северск, г. Северск-13, Россия, а/я № 130

2 – ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
634009, г. Томск, Россия, пер. Кооперативный 5

3 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

Введение. Поиск биологических маркеров индивидуальной радиочувствительности человека остаётся чрезвычайно актуальной проблемой современной радиационной медицины.

Цель – провести оценку aberrаций числа копий ДНК (copy number aberration – CNA) в лимфоцитах крови работников, подвергшихся хроническому профессиональному радиационному воздействию.

Методы. Обследовано 20 условно здоровых работников Сибирского химического комбината, подвергшихся внешнему радиационному воздействию. Всем обследованным лицам провели стандартный цитогенетический анализ. Выделенная ДНК из образцов крови исследована с использованием микроматрицы «CytoScan HD Array» («Affymetrix», США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 4.3» («Affymetrix», США).

Результаты. У 4 из 20 работников обнаружено 4 CNA различных типов: 3 мозаичные амплификации, 1 мозаичная делеция.

Заключение. Обнаруженные 4 CNA, кандидата на происхождение *de novo*, не индуцированы хроническим низкоинтенсивным облучением, так как не показали ассоциацию с ним. В данном исследовании, предположение о связи возникших *de novo* CNA с радиочувствительностью индивидов не подтвердилось. Необходимы дальнейшие исследования механизмов сохранения хромосомных aberrаций с целью обнаружения маркеров индивидуальной радиочувствительности.

Ключевые слова: copy number aberration, хромосомные aberrации, ионизирующее излучение, микроматричный анализ.

Для цитирования: Исубакова Д.С., Литвяков Н.В., Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпленкова М.Ю., Мильто И.В., Тахауов Р.М. Анализ aberrаций числа копий ДНК в лимфоцитах крови работников атомной отрасли, подвергшихся внешнему радиационному воздействию. *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 32-35.

Автор для корреспонденции: Исубакова Д.С.; e-mail: mail@sbrs.seversk.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке ФМБА России, государственные контракты № 56.003.20.0 от 09.06.2020 и № 56.002.21.0 от 15.06.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.10.2022

Analysis of copy number aberrations in blood lymphocytes of nuclear industry workers exposed to external radiation

Isubakova D.S.¹, Litviakov N.V.^{1,2}, Tsybmal O.S.¹, Usova T.V.¹, Tsyplenkova M.Y.¹, Milto I.V.^{1,3}, Takhauov R.M.^{1,3}

1 – Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical-Biological Agency,
P.O. Box No. 130, Seversk-13, Tomsk region, 636013, Russian Federation

2 – Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny str., Tomsk, 634009, Russian Federation

3 – Siberian State Medical University
2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

Introduction. The search for biological markers of individual radiosensitivity remains an extremely urgent problem of modern medicine.

Aim: to evaluate of the copy number aberrations in the blood lymphocytes of workers exposed to occupational radiation exposure.

Methods. The object of the study was the blood of 20 relatively healthy workers of the Siberian Chemical Combine, exposed to external radiation. A standard cytogenetic analysis was performed for all the examined individuals. The blood DNA was examined using a «CytoScan HD Array» microarray («Affymetrix», USA). To process the results of microchipping, a program was used «Chromosome Analysis Suite 4.3» («Affymetrix», США).

Results. For 4 workers found out 4 CNA: 3 mosaic amplifications, 1 mosaic deletion.

Conclusion. The detected 4 candidates for the origin of *de novo* CNA were not induced by chronic low-intensity radiation, as they did not show an association with radiation. In this study, the assumption about the connection of *de novo* CNA with the radiosensitivity of individuals was not confirmed. Further studies of the mechanisms of XA preservation are needed in order to detect markers of individual radiosensitivity.

Keywords: copy number aberration; chromosomal aberrations; ionizing radiation; microarray analysis.

For citation: Isubakova D.S., Litviakov N.V., Tsymbal O.S., Usova T.V., Tsyplenkova M.Y., Milto I.V., Takhauov R.M. Analysis of copy number aberrations in blood lymphocytes of nuclear industry workers exposed to external radiation. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2022; 21(11): 32-35. (In Russ.)

Corresponding author: Isubakova D.S., e-mail: mail@sbrsc.seversk.ru

Funding. The study was supported by the FMBA of Russia government contracts No. 56.003.20.0 from 09.06.2020 and No. 56.002.21.0 from 15.06.2021.

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

Accepted: 20.10.2022

Введение

В 2014 г. в Северском биофизическом научном центре ФМБА России (СБН Центр) было проведено исследование на микроматрице «CytoScan HD Array» («Affymetrix», США) ДНК лимфоцитов крови 46 работников Сибирского химического комбината (СХК), подвергавшихся хроническому облучению в результате профессиональной деятельности [1]. По аналогии с 2014 г. в 2021 г. с целью установления связи aberrаций числа копий ДНК (copy number aberration – CNA) с хроническим облучением было проведено исследование на микроматрице «CytoScan HD Array» («Affymetrix», США) ДНК лимфоцитов крови 20 работников СХК, подвергавшихся хроническому облучению.

Повреждения ДНК, вызванные ионизирующим излучением [2, 3], восстанавливаются системой репарации ДНК. Нерепарированные или неправильно репарированные одонитевые и двунитевые разрывы ДНК приводят к появлению множественных хромосомных aberrаций (ХА) разных типов [4, 5], в том числе к образованию CNA. CNA представлены делециями или амплификациями и могут влиять на экспрессию генов [6, 7]. CNA наравне с другими элементами генома обеспечивают его структурную вариабельность и представлены патогенными и нейтральными вариантами. Понимание природы генетических вариаций у человека обосновывает необходимость учёта их влияния на индивидуальный риск развития заболеваний, в том числе обусловленных действием ионизирующего излучения. Модельные исследования показали, что генетические вариации могут существенно влиять на распределение канцерогенного риска среди облучённых людей [8]. Возможно, что клетки с образовавшимися *de novo* CNA будут накапливаться и детектироваться, но только у индивидов, у которых есть нарушения системы репарации ДНК. Можно предположить, что CNA могут

возникать *de novo* под действием радиации и фактически могут отражать способность к репарации одонитевых разрывов ДНК, и сама детекция образовавшихся *de novo* CNA в геномной ДНК крови этих индивидов будет свидетельствовать об их радиочувствительности.

Цель – провести оценку CNA в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся профессиональному радиационному воздействию.

Методы

Обследовано 20 условно здоровых работников СХК, подвергшихся внешнему радиационному воздействию. Все работники-доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Северского биофизического научного центра.

Средняя доза внешнего облучения составила $233,27 \pm 27,53$ мЗв; возраст работников – $63,60 \pm 2,48$ лет; стаж – $33,40 \pm 2,34$ лет. Всем обследованным лицам проведён стандартный цитогенетический анализ [9]. Выделение ДНК осуществляли из полученных образцов крови при помощи набора «QIAamp DNA mini Kit» («Qiagen», Германия). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали на спектрофотометре «NanoDrop-2000» («ThermoScientific», США). Микроматричный анализ проводили на микроматрицах «CytoScan HD Array» («Affymetrix», США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 4.3» («Affymetrix», США). Во всех случаях показатель *snpc* был выше 15. При помощи программы в хромосомах определяли CNA – делеции и амплификации (Loss и Gain) и мозаичные делеции и амплификации (Loss Mosaic и Gain Mosaic).

Критерии отбора кандидатов на происхождение индуцированных облучением *de novo*: рассматривались только CNA размером более 100 т.п.н. Они встречаются намного реже, чем CNA размером от 1 т.п.н. Не рассматривались CNA в теломерных и прицентромерных районах хромосом. В качестве образовавшихся *de novo* CNA всегда признавались мозаичные делеции и амплификации, которые имели 4 аллельных пика. Если у обследованного работника СХК в крови наблюдалось более 5 CNA размером от 100 т.п.н., эти CNA рассматривались как кандидаты, возникшие *de novo*.

Обследованные работники СХК, подвергавшиеся облучению, были разделены на 2 группы. Если у обследованного работника находили хотя бы один участок с образовавшимся *de novo* CNA, то его относили в опытную группу. Всех, у кого не было найдено ни одной образовавшейся *de novo* CNA, определяли в контрольную группу. В опытную группу были включены 4 работника, в контрольную группу — 16 работников. Для выборок вычислялись M — среднее арифметическое и SE — стандартная ошибка. Для сравнения уровней цитогенетических показателей в различных группах использовали непараметрический критерий Вилкоксона — Манна — Уитни с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

Обнаружено 4 кандидата на происхождение *de novo* CNA различных типов, из них 3 мозаичные амплификации, 1 мозаичная делеция. Характеристика обнаруженных CNA представлена в табл. 1.

На следующем этапе проведено сравнение частоты ХА в опытной и контрольной группах (табл. 2). Группы не различались по суммарной дозе внешнего облучения ($p = 0,7150$). Один из возможных способов, который косвенно может показать индивидуальную радиочувствительность индивида, — обнаружение повышенного уровня ХА в лимфоцитах крови, определяемых стандартным методом, при равных дозовых нагрузках. Статистически значимых различий между группами не наблюдается, что, скорее всего, связано с малочисленностью выборки.

Выводы

В исследовании 2014 г. было показано наличие в лимфоцитах крови 19/46 работников СХК, подвергавшихся длительному радиационному воздействию, низкой интенсивности CNA, образовавшихся *de novo*. Однако данные полученные в 2021 г. не показали связь CNA с хроническим низкоинтенсивным облучением. Обнаруженные 4 CNA, кандидата на происхождение *de novo*, не индуцированы хроническим низ-

Таблица 1. Хромосомная локализация, тип, размеры обнаруженных CNA и локализованные в регионе этих CNA гены
Table 1. Chromosomal localization, type, size of detected CNAs and genes localized in the region of these CNAs

№	Тип CNA	Локализация	Размер, т.п.н.	Начальный маркер	Конечный маркер	Гены в локусе CNA
534	Gain Mosaic	5q21.2	586.565	C-7JWBC	C-3DKRD	no
1015	Gain Mosaic	8q24.12	1140.412	S-4QUNT	C-3SFGQ	<i>SAMD12, SAMD12-AS1, TNFRSF11B, COLEC10, LOC101927513, MAL2, MAL2-AS1, MIR548AZ, CCN3, ENPP2</i>
965	Loss Mosaic	2p14	863.74	C-4PUFM	C-7DFJC	<i>MIR4778, LINC01873, MEIS1-AS3, MEIS1, MEIS1-AS2, LINC01798</i>
705	Gain Mosaic	q14.1	4887.053	S-3GADT	S-3BDLL	<i>NARS2, TENM4, MIR708, MIR5579, LINC02720, MIR4300HG, MIR4300, FAM181B, PRCP, DDIAS, RAB30, SNORA70E, RAB30-DT, PCF11, LOC100506282, PCF11-AS1, ANKRD42, CCDC90B, DLG2</i>

Примечание: Loss — делеция (потеря); Gain — амплификация (усиление); GainMosaic — мозаичная амплификация; Loss Mosaic — мозаичная делеция.

Таблица 2. Частота ХА, выявляемых при стандартном цитогенетическом исследовании, у работников, подвергавшихся длительному техногенному радиационному воздействию**Table 2. The frequency of CA detected by standard cytogenetic study in workers exposed to long-term man-made radiation exposure**

Показатель	Частота ХА, на 100 клеток		p-value
	Опытная группа, n = 4	Контрольная группа, n = 16	
Количество аберрантных клеток	2,29 ± 0,31	3,87 ± 0,54	0,0678
Хроматидные фрагменты	0,26 ± 0,06	1,23 ± 0,26	0,1088
Парные фрагменты	0,46 ± 0,08	1,33 ± 0,33	0,0678
Кольцевые хромосомы	0,13 ± 0,08	0,12 ± 0,06	нет значений
Дицентрические хромосомы	1,43 ± 0,42	0,97 ± 0,26	0,1441

Примечание: М – среднее арифметическое, SE – стандартная ошибка средней, n – количество обследуемых; p определяли по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

коинтенсивным облучением. В данном исследовании предположение о связи возникших *de novo* CNA с радиочувствительностью индивидов не подтвердилось. Необходимы дальнейшие исследования механизмов сохранения ХА с целью обнаружения маркёров индивидуальной радиочувствительности.

Литература

1. Литвяков Н.В., Халюзова М.В., Тахауов Р.М. и др. Аберрации числа копий ДНК в лимфоцитах крови лиц, подвергавшихся профессиональному облучению, как потенциальный маркёр их высокой радиочувствительности. Вестник Томского государственного университета. Биология. 2015;2(30):113–133. doi: 10.17223/19988591/30/8.
2. Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA repair(Amst). 2007;6(7):923–935. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.006
3. Ward J. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 1988;35:95–125. doi: 10.1016/s0079-6603(08)60611-x
4. Литвяков Н.В., Гончарик О.О., Межеричский С.А. и др. Генетические аспекты развития злокачественных новообразований в условиях длительного радиационного воздействия. Под общ. ред. Р.М. Тахауова. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2009. 130 с.
5. Снигирева Г.П. Биологическая дозиметрия на основе цитогенетического анализа. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. 2011;1(11).
6. Zhang F., Gu W., Hurler M.E., Lupski. Copy number variation in human health, disease, and evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:451–481. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164217.
7. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles. Brief Bioinform. 2012;13(3):305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.
8. Pharoah P.D., Antoniou A., Bobrow M. et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. Nat Genet. 2002;31(1):33–36. doi: 10.1038/ng853.
9. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др. Частота и спектр цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината. Радиационная биология. Радиоэкология. 2014;54(3):283–296. doi: 10.7868/S0869803114030084

References

1. Litviakov N.V., Khalyuzova M.V., Takhaouov R.M., et al. Aberratsii chisla kopiy DNK v limfotsitakh krovi lits, podvergavshikhsya professional'nomu oblucheniuyu, kak potentsial'nyy markor ikh vysokoy radiochuvstvitel'nosti [DNA copy number variations of blood lymphocytes in people exposed to occupational irradiation as a possible marker of high radiosensitivity]. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya [Tomsk State University Journal of Biology]. 2015;2(30):113–133. doi: 10.17223/19988591/30/8.
2. Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA repair(Amst). 2007;6(7):923–935. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.006
3. Ward J. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 1988;35:95–125. doi: 10.1016/s0079-6603(08)60611-x
4. Litviakov N.V., Goncharik O.O., Mezheritsky S.A. Geneticheskiye aspekty razvitiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy v usloviyakh dolgovremennogo radiatsionnogo vozdeystviya. Pod obshch. red. R.M. Takhaouov [Genetic aspects of the development of malignant neoplasms under long-term radiation exposure. Ed. R.M. Takhaouov]. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo universiteta [Tomsk: Tomsk University Press], 2009. 130 p. (In Russ.)
5. Snigiryova G.P. Biologicheskaya dozimetriya na osnove tsitogeneticheskogo analiza [Biological dosimetry on the strength of cytogenetic analysis]. Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii [Vestnik of the Russian scientific center of roentgenoradiology]. 2011;1(11). (In Russ.)
6. Zhang F., Gu W., Hurler M.E., Lupski. Copy number variation in human health, disease, and evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:451–481. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164217.
7. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles. Brief Bioinform. 2012;13(3):305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.
8. Pharoah P.D., Antoniou A., Bobrow M. et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. Nat Genet. 2002;31(1):33–36. doi: 10.1038/ng853.
9. Litviakov N.V., Freidin M.B., Khalyuzova M.V., et al. Chastota i spektr tsitogeneticheskikh anomalii u rabotnikov Sibirskogo khimicheskogo kombinata [Frequency and spectrum of cytogenetic anomalies in workers of the Siberian Chemical Combine]. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya [Radiation biology. Radioecology]. 2014;54(3):283–296. doi: 10.7868/S0869803114030084 (In Russ.)