

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.40-43>

## **Влияние хронического облучения на теломерные участки хромосом Т-лимфоцитов периферической крови человека**

**Кривошапова Я.В.**

ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России  
454141, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского 68-А

Цель работы состояла в исследовании влияния хронического облучения и нерадиационного фактора (пола) на показатель длины теломерных районов хромосом человека. Объект исследования: Т-клетки периферической крови жителей прибрежных сел реки Теча, подвергшихся хроническому облучению. Была проведена оценка теломерных районов 1, 2, 3, 13, 14, 15, 19, 20, 21 и 22 пар хромосом методом флуоресцентного окрашивания (Q-FISH) теломер в комбинации с контрокрашиванием DAPI. В результате проведенного исследования было отмечено, что длина теломер в одной клетке широко варьируется, а размер теломерного района не зависит от длины хромосомы или хромосомного плеча, на котором он расположен. У мужчин показатель длины теломер имеет достоверно более высокие значения по сравнению с женщинами. В группе сравнения длина теломерных районов во многих хромосомах достоверно превышала таковую в группе облученных.

**Ключевые слова:** теломерные районы хромосом, флуоресцентная *in situ* гибридизация, FISH, хроническое радиационное воздействие.

**Для цитирования:** Кривошапова Я.В. Влияние хронического облучения на теломерные участки хромосом Т-лимфоцитов периферической крови человека. *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 40-43.

**Автор для корреспонденции:** Кривошапова Я.В.; e-mail: yana@urcrm.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 20.10.2022

## **Chronic exposure effect on the telomere regions of the chromosomes of the human peripheral blood lymphocytes**

**Krivoshchapova Ya.V.**

Ural Research Center for Radiation Medicine FMBA  
68-A, Vorovskogo str., Chelyabinsk, 454141, Russian Federation

The aim of the research was to study the influence of the chronic radiation exposure and non-radiation factors on the length of the telomere regions of the human chromosomes. The object of the study: peripheral blood T-cells of the chronically exposed residents of the Techa riverside settlements.

The length of the telomere regions of the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 13<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 19<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 22<sup>nd</sup> pair of chromosomes has been estimated using the method of fluorescent staining (Q-FISH) of the telomeres coupled with DAPI counterstaining. The findings of the study demonstrate that the length of the telomeres in one cell varies greatly; the size of the telomere region does not depend on the length of a chromosome or a chromosome arm where it is located. The value of the telomere length in men is statistically significantly high as compared to women. In the comparison group, the length of the telomere regions in many chromosomes statistically significantly exceeds that in the exposed group.

**Keywords:** telomere regions of the chromosomes, fluorescent *in situ* hybridization, FISH, chronic radiation exposure.

**For citation:** Krivoshchapova Ya.V. Chronic exposure effect on the telomere regions of the chromosomes of the human peripheral blood lymphocytes. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2022; 21(11): 40-43. (In Russ.)

**Corresponding author:** Krivoshchapova Ya.V.; e-mail: yana@urcrm.ru

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the FMBA of Russia.

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

**Accepted:** 20.10.2022

## Введение

**Н**а длину теломерных участков в клетках человека влияет множество факторов, как генетических, так и факторов окружающей среды. Были выявлены наследственные и некоторые связанные с возрастом болезни, при которых у человека снижен показатель длины теломер [1]. Ионизирующее излучение является одним из факторов, который влияет на теломерные районы хромосом, а также постоянно присутствует в жизни современного человека — это воздействие естественной фоновой радиации, медицинские диагностические процедуры и т.д. [2]. Наличие радиационно-индуцированных повреждений ДНК в теломерах может привести к их ускоренному укорочению, т.к. повреждения могут препятствовать правильной репликации во время пролиферации клеток, что, в свою очередь, может способствовать многоступенчатому процессу канцерогенеза [3].

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния хронического низкоинтенсивного облучения, а также нерадиационного фактора (пола) на показатель относительной длины теломерных районов хромосом в Т-лимфоцитах жителей прибрежных сёл реки Теча.

Объектом настоящего исследования были Т-лимфоциты периферической крови. Т-лимфоциты являются удобным модельным объектом для исследований вследствие простоты получения исходного материала и высокой концентрации клеток. В периферической крови они находятся в интерфазе, тем самым представляя собой синхронизированную популяцию клеток с низким спонтанным уровнем аберраций хромосом [4].

В ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России обследуются лица, проживающие на Южном Урале, которые в результате сброса жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк» в реку Течу подверглись хроническому облучению (внутреннему — за счет поступления и накопления в организме радионуклидов  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ , внешнему — за счет  $\gamma$ -облучения) [5,6,7]. Воздействию подвергались клетки-предшественники Т-лимфоцитов в костном мозге, где основным дозообразующим радионуклидом был  $^{90}\text{Sr}$ .

## Методы

Всего выборка объединяла 37 человек (24 женщины и 13 мужчин) в возрасте от 61 до 84 лет. Расчёт индивидуализированных суммарных доз выполнялся по системе TRDS-2016.

Для изучения влияния хронического облучения на длину теломерных участков были сформированы две группы. Группу облученных составили 12 доноров женского пола с дозами на клетки костного мозга (ККМ) от 0,64 Гр до 4,67 Гр в возрасте от 70 до 84 лет. Группа сравнения состояла из 12 доноров женского пола в возрасте от 61 до 83 лет, доза облучения на ККМ  $<0,07$  Гр.

Корреляция между длиной теломерного участка и размером плеча хромосомы была оценена у 25 доноров с дозами на ККМ от 0 до 0,07 Гр, возраст обследованных от 61 до 83 лет.

Для исследования влияния пола на длину теломер группы были выровнены по количеству обследованных, возрасту, дозе облучения на ККМ ( $<0,01$  Гр). В группу «Женщины» вошли 10 доноров в возрасте от 61 до 75 лет. Группа «Мужчины» состояла из 9 доноров в возрасте от 61 до 72 лет.

Цитогенетические препараты из Т-лимфоцитов получали согласно протоколу [8], который включает четыре этапа: культивирование клеток до стадии метафазы, гипотоническую обработку клеток, фиксацию метафазных пластинок и приготовление препаратов хромосом.

Теломерные районы хромосом оценивались с применением теломерных зондов Telomere FISH Kit/Cy3 (ДАКО, Дания). Используемая при изготовлении зонда Cy3-конъюгированная пептидная нуклеиновая кислота (ПНК) представляет собой синтетический аналог ДНК, способный связываться с ДНК хромосом по правилам спаривания оснований. В ПНК сахарофосфатный остов заменен нейтральным пептидно-полиамидным остовом, при этом расстояние между основаниями остается точно таким же, как в ДНК. Зонд этого комплекта не распознает субтеломерные последовательности хроматина и, следовательно, позволяет окрасить только теломерные районы хромосом [9]. Подробный протокол Q-FISH окрашивания хромосомных препаратов представлен в работе [10].

Анализ флуоресцентно окрашенных препаратов проводился на флуоресцентном микроскопе AxioImagerZ2 (Zeiss, Германия) с фильтрами DAPI и SpO.

Для получения результата все образцы при съемке были нормированы на объект с постоянной флуоресценцией. Для этого окрашивали центромерную область второй хромосомы. Интенсивность сигнала в каждой клетке принимали за 100%. Измерения проводили с использованием теломерного модуля программы ISIS (MetaSystems). В кариограмме для каждой

хромосомы определяли область измерения (отдельно для р- и q-плеч хромосом). На второй паре хромосом, помимо этого, также была обозначена область измерения центромерного сигнала. Результат был выражен в процентах отношения длины теломерного (Т) сигнала к длине центромерного (С) – (%Т/С).

Было проанализировано 20-30 метафаз на одного обследуемого. Из полученных измерений сформировали таблицу. Проведена оценка относительной длины теломерных районов для пар метацентрических (1, 3, 19, 20) и акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21, 22).

Для статистической обработки был использован программный пакет STATISTICA 12. Для сравнения показателей, полученных в двух группах, использовали непараметрический тест Манна-Уитни.

### Результаты

Длина теломер в одной клетке широко варьируется. Так, в одной хромосоме показатель длины теломерных районов колеблется от 0,9 (%Т/С) до 92,84(%Т/С), а в хромосоме 20 – от 1,3 (%Т/С) до 88,3 (%Т/С).

В группе сравнения у женщин длина теломерных районов в хромосомах 1, 3, 13, 15, 20, 21 достоверно превышала таковую у женщин, которые подвергались хроническому радиационному воздействию.

Длина теломерных районов – величина, не зависящая от размера хромосомы и хромосомного плеча. Статистически значимые различия обнаружены в хромосомах 13, 14, 15 и 21 у женщин, где длина теломерных районов коротких плеч превышала значения длины теломер в длинных плечах.

У мужчин во всех плечах выбранных хромосом показатель длины теломер имеет более высокие значения, чем у женщин ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Основной акцент в работе был сделан на изучении относительной длины теломерных районов в метацентрических и акроцентрических хромосомах, как наиболее различающихся по длине и коэффициенту отношения хромосомных плеч. Для исследования был выбран метод Q-FISH, который позволяет визуализировать каждую теломеру в конкретной паре хромосом. В этом преимущество данного метода при сравнении с ПЦР, где для исследования выделяется ДНК из всех клеток, разрушается структура хромосом, что позволяет получить лишь усредненное значение длины теломерных районов ДНК обследуемого.

По нашим данным, относительная длина теломер у каждого донора варьируется в широком диапазоне. Теломеры по длине различаются как в пределах одной клетки, так и в пределах одной хромосомной пары, что соответствует литературным данным.

При исследовании влияния хронического облучения на длину теломер было обнаружено, что у женщин из группы сравнения длина теломерных районов в хромосомах 1, 3, 13, 15, 20, 21 достоверно превышала таковую у облученных женщин ( $p < 0,05$ ). Для остальных хромосом различий между сравниваемыми группами выявлено не было.

Результаты исследования позволили заключить, что длина теломерного района не зависит от размера хромосомы или плеча, на котором она расположена. Так, можно было бы ожидать, что у акроцентрических хромосом теломеры коротких плеч могут быть короче, т.к. часто они даже не видны в микроскоп. Но у женщин в коротких плечах исследованных хромосом наблюдалась тенденция к удлинению теломерных участков.

В ходе исследования мы выявили зависимость длины теломерных участков хромосом от пола: у мужчин длина теломер в исследованных группах хромосом была достоверно выше, чем у женщин.

Анализ данных позволяет нам быть уверенными в том, что у клетки существуют разные механизмы поддержания целостности хромосом, структура которых может быть изучена с применением высокотехнологичных методических подходов. Результаты представленного исследования следует рассматривать как предварительные. Для их подтверждения выборка обследуемых лиц будет расширена.

### Литература

1. Turner K.J., Vasu V., Griffin D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 2019 Jan 19;8(1):73.
2. Reste J., Zvigule G., Zvagule T. et al. Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *Radiation Research*. 2014;55(6):1089-100.
3. Tong J. Aging and age-related health effects of ionizing radiation. *Radiation Medicine and Protection*. 2020;(1):15-23.
4. Севаньяев А.В. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле. М.: Энергоатомиздат. 1987. 160 с.
5. Последствия радиоактивного загрязнения реки Теча. Под ред. Проф. А.В. Аклеева. Челябинск. 2016. 400 с.
6. Возилова А.В., Кривошапова Я.В. Исследование частоты инверсий и комплексных транслокаций в Т-лимфоцитах у облученных жителей Южного Урала. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2022;62(4):415–422.
7. Возилова А.В., Ахмадулина Ю.Р., Пушкарев В.П. и др. Клеточный состав периферической крови у внутриутробно облученных жителей р. Теча. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020;60(4):341-351.

8. Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., et al. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. *Mutation Research*.2013;756(1-2):115-118.
9. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*.1991;254(5037):1497-1500.
10. Perner S., Brüderlein S., Hasel C., et al. Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *The American Journal of Pathology*.2003;163(5):1751-1756.
5. Posledstviya radioaktivnogo zagryazneniya reki Techa. Pod red. Prof. A.V. Akleyeva [Consequences of radioactive contamination of the Techa River. Ed. Prof. A.V. Akleev]. Chelyabinsk. 2016. 400 p. (In Russ.)
6. Vozilova A.V., Krivoshechpova Ya.V. Issledovaniye chastoty inversiy i kompleksnykh translokatsiy v T-limfotsitakh u obluchennykh zhiteley Yuzhnogo Urala [Investigation of the frequency of inversions and complex translocations in T-lymphocytes in irradiated residents of the Southern Urals]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya [Radiation biology. Radioecology]*. 2022;62(4):415–422. (In Russ.)
7. Vozilova A.V., Akhmadullina Yu.R., Pushkarev V.P. Kletochnyy sostav perifericheskoy krovi u vnutriutrobno obluchennykh zhiteley r. Techa [Peripheral Blood Cell Composition in the In-Utero Exposed Techa River Residents]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya [Radiation biology. Radioecology]*. 2020;60(4):341-351. (In Russ.)
8. Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., et al. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. *Mutation Research*.2013;756(1-2):115-118.
9. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*.1991;254(5037):1497-1500.
10. Perner S., Brüderlein S., Hasel C., et al. Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *The American Journal of Pathology*.2003;163(5):1751-1756.

## References

1. Turner K.J., Vasu V., Griffin D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*.2019 Jan 19;8(1):73.
2. Reste J., Zvigule G., Zvagule T. et al. Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *Radiation Research*. 2014;55(6):1089-100.
3. Tong J. Aging and age-related health effects of ionizing radiation. *Radiation Medicine and Protection*. 2020;(1):15-23.
4. Sevankaev A.V. Radiochuvstvitel'nost' khromosom limfotsitov cheloveka v mitoticheskom tsikle [Radiosensitivity of chromosomes of human lymphocytes in the mitotic cycle]. M.: Energoatomi-dat.1987.160 p. (In Russ.)