

В.Ю. Нугис¹, Г.П. Снигирёва², Е.Е. Ломоносова¹, М.Г. Козлова¹, В.А. Никитина¹

ТРЁХЦВЕТНЫЙ FISH-МЕТОД: КРИВЫЕ ДОЗА–ЭФФЕКТ ДЛЯ ТРАНСЛОКАЦИЙ В КУЛЬТУРАХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ *IN VITRO*

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава РФ, Москва

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

РЕФЕРАТ

Цель: Построение кривых доза–эффект для транслокаций, выявленных с помощью трёхцветного FISH-метода, по результатам цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови здоровых доноров после гамма-облучения *in vitro*.

Материал и методы: Использовалась венозная кровь трёх доноров (2 мужчин и 1 женщина в возрасте от 28 лет до 41 года), подвергнутая гамма-облучению *in vitro* от источника ⁶⁰Co в дозах 0,10; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 и 3,00 Гр при температуре 37 °С (мощность дозы 0,5 Гр/мин). Для трёхцветного FISH-окрашивания использовались два разных набора ДНК-зондов к 1, 4, 12 и 2, 3, 8 парам хромосом. Для анализа отбирали метафазы с квазидиплоидным числом хромосом (40–46) и полным набором всех FISH-окрашенных хромосом с учётом всей их суммарной длины. Также производилась дифференциация стабильных и нестабильных клеток. При цитогенетическом анализе применялась традиционная терминология с обозначением транслокаций как реципрокных (полных, двухсторонних), нерципрокных (терминальных, неполных или односторонних) или интерстициальных.

Результаты: Полученные численные данные были использованы для сравнения статистических частот FISH-регистрируемых транслокаций при использовании разных наборов ДНК-зондов, при подсчёте aberrаций хромосом во всех (нестабильных и стабильных) и стабильных метафазных клетках, сопоставлении частот FISH-регистрируемых транслокаций и дицентриков и оценке вклада уровня транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом в общую частоту транслокаций.

Цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток выявил тенденцию к регистрации более низких уровней транслокаций, чем при анализе всех клеток (нестабильных и стабильных), при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр. Уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом оказался очень низким, что явно не способствует увеличению чувствительности FISH-метода при ретроспективной оценке дозы по сравнению с его одноцветным вариантом. В то же время, трёхцветная FISH-окраска позволяет выявлять такие варианты хромосомных перестроек, которые не регистрируются с помощью одноцветного FISH-метода.

Заключение: Построенные кривые доза–эффект в целом соответствовали линейно-квадратичной зависимости. Дозовые зависимости, полученные для транслокаций при использовании двух разных выбранных трёхцветных наборов ДНК-зондов, статистически значимо не различаются между собой.

Ключевые слова: периферическая кровь, культура лимфоцитов, гамма-облучение *in vitro*, трёхцветный FISH-метод, транслокации, зависимость доза–эффект

Для цитирования: 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*. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):12–20.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20

Введение

В периодически переиздаваемых международных рекомендациях МАГАТЭ [1] по использованию анализа aberrаций хромосом в качестве способа биологической дозиметрии в связи с радиационными происшествиями большое внимание уделяется не только индикации дозы острого облучения в ближайшие сроки после воздействия с помощью классического метода окраски хромосом, но и возможностям применения различных цитогенетических подходов для ретроспективной оценки полученных доз. Обусловлено это наличием случаев позднего поступления пациентов в специализированные учреждения; обращениями граждан, проживающих/проживавших на загрязнённых территориях; необходимостью решения вопросов медико-социальной экспертизы при установлении причинной связи развившихся заболеваний с радиационным воздействием для верификации самого факта переоблучения и при попытках определить полученную дозу в отдалённые сроки.

В настоящее время для этих целей из цитогенетических методов наиболее часто используется вариант одноцветного FISH-окрашивания хромосом, что позволяет выявлять реципрокные транслокации, не представляющие механического препятствия для протекания митоза и относящиеся поэтому к стабильному (во времени) типу перестроек хромосом [1]. При этом используются комплементарные к ДНК хромосом наборы цельнохромосомных ДНК-зондов с присоединённым каким-либо одним флуоресцентным красителем. Обычно выбирают три пары хромосом из групп А, В и С, так как они являются наиболее крупными в кариотипе человека. В то же время, по видимому, исследователи 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. Правда, её следовало бы проверить более досконально. Также было бы интересно узнать, насколько может повлиять на чувствительность

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

В свете выше сказанного было предпринято настоящее изучение продукции аберраций хромосом (главным образом реципрокных транслокаций) в культурах лимфоцитов периферической крови людей после гамма-облучения *in vitro* с помощью трёхцветного варианта FISH-окрашивания. При этом были использованы два набора ДНК-зондов к разным парам хромосом.

Материал и методы

Материалом цитогенетических исследований служила полученная из кубитальной вены кровь трёх здоровых доноров (двое мужчин в возрасте 35 лет и 41 год и одна женщина в возрасте 28 лет). Первоначальный забор крови необходимого суммарного объёма (44 мл) производился примерно по 8–9 мл в вакуумные пластиковые пробирки BD Vacutainer с гепарином лития. Затем кровь в стерильных условиях разливалась в стерильные пробирки типа Эппендорф объёмом 2 мл. Радиационное воздействие на кровь в этих пробирках осуществляли *in vitro* при 37 °С (водяная баня) гамма-излучением ⁶⁰Со 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 при мощности дозы 0,5 Гр/мин (не менее двух пробирок для каждой дозы). Также две пробирки оставались необлучёнными для регистрации контрольного уровня аберраций хромосом.

Облучённая и необлучённая кровь была использована для постановки в стерильных условиях культур лимфоцитов периферической крови в соответствии со следующей методикой. Отдельные порции цельной крови объёмом 2 мл вносились в культуральную смесь 18 мл среды RPMI 1640 с GlutaMAX™-I (фирма Thermo Fisher Scientific) с 20% инактивированной телячьей сывороткой и добавлением фитогемагглютина (ФГА-П) в конечной концентрации 20 мкг/мл (фирма «ПанЭко», Россия) и антибиотиков стрептомицина и пенициллина (растворены предварительно в среде). Культивирование производили в стерильных культуральных флаконах 25 см² (фирма NUNC) в вертикальном положении. Для того чтобы избежать появления в культурах существенного числа метафаз во втором митозе, время инкубации в термостате при 37 °С составило 50 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 стандартным способом: гипотония с помощью подогретого до 37 °С 0,075 М KCl в течение 10–20 мин; центрифугирование при 3000 об./мин в течение 5 мин; отсасывание надосадочной жидкости и фиксация клеток охлажденной в холодильнике смесью метанола (96%-этанол) и ледяной уксусной кислоты в объёмном соотношении 3:1; взвесь оставляли в холодильнике на 20 мин; после — центрифугирование при 1500 об./мин в течение 10 мин; слив надосадочной жидкости; смена фиксатора и ресуспендирование осадка ещё два раза с постепенным уменьшением объёма добавляемого фик-

сатора до примерно 1 мл; раскапывание полученной взвеси (3–4 капли) на чистые охлаждённые обезжиренные предметные стёкла и высушивание препаратов на термоплате при 45 °С.

При выполнении трёхцветного FISH-метода окрашивания хромосом использовали готовые наборы ДНК-зондов к целым хромосомам № 1, 4, 12 и № 2, 3, 8 (XCP — chromosome painting probe — Probe Mix, Customized 3 colors; контркрашитель — DAPI) фирмы MetaSystems (Германия). По суммарному относительному содержанию ДНК оба этих набора почти идентичны друг к другу. Доля ДНК в них по отношению к диплоидному набору хромосом у мужчин равняется 0,1917 и 0,1966 соответственно (таблица для данного расчёта приведена в рекомендациях [1]). При обработке и окраске препаратов хромосом руководствовались прилагаемой к набору фирменной инструкцией.

Полученные окрашенные препараты были помещены в ячейки автоматизированного предметного столика системы Metafer 4 (MetaSysytems, Германия). С её помощью производился автоматический поиск метафаз на разных препаратах и их фотографирование с использованием различных световых фильтров. В результате в базе данных устройства для каждого донора был накоплен двойной набор метафазных клеток с трёхцветными FISH-окрашенными тремя парами хромосом и контрокрашенными (DAPI) остальными хромосомами, которые в дальнейшем подвергались цитогенетическому анализу с использованием компьютерных дисплеев. Для анализа отбирали метафазы с квазидиплоидным числом хромосом (40–46) и полным набором всех FISH-окрашенных хромосом с учётом всей их суммарной длины. Такой подход привёл к тому, что метафазы, содержавшие делеции по этим хромосомам, не были включены в итоговые результаты анализа. В конечный расчёт вошли только перестройки хромосомного типа, в продукции которых участвовали FISH-окрашенные регионы.

Также производилась дифференциация стабильных и нестабильных клеток. К первым относились неабберрантные метафазы и метафазы, содержавшие только стабильные перестройки хромосом — реципрокные транслокации, перичентрические инверсии, инсерции, контрокрашенные атипичные хромосомы. Во-вторых, могли наблюдаться и нестабильные аберрации хромосом — FISH-окрашенные и контрокрашенные дицентрики, центрические и ацентрические кольца, парные фрагменты.

При цитогенетическом анализе применялась традиционная терминология с обозначением транслокаций как реципрокных (полных, двухсторонних), нереципрокных (терминальных, неполных или односторонних) или интерстициальных [1]. К последним относятся инверсии и вставки (инсерции). Противоположные понятия, то есть полная — неполная или реципрокная — нереципрокная, связаны с концепциями механизмов образования транслокаций. Аберрации считаются завершёнными (полными), когда все отломанные куски воссоединились (хотя бы и неправильно) и неполными, когда один или несколько участков остаются невоссоединёнными. Нереципрокность транслокации означает, что перенос материала произошёл только от одной хромо-

сомы к другой, т.е. однонаправлено. Ко второй же хромосоме никакой дополнительный материал не присоединился. Поэтому в рекомендациях МАГАТЭ [1] считается, что для целей биологической дозиметрии исключительно на основе их внешнего вида, по-видимому, лучше называть транслокации двух- или односторонними без каких-либо теоретических выводов о механизмах их возникновения. На самом деле, видимая «односторонность» транслокации не обеспечивает надежную оценку неполноты или нереципрокности обмена [1]. Цитологически видимая неполная транслокация может оказаться полной на молекулярном уровне, так как один из переносимых сегментов может быть слишком мал для визуализации под микроскопом [2]. В работе [3] граница разрешения современной FISH-технологии полагается равной $(11-15) \times 10^6$ н.п. В статье [4] с помощью мечения теломер облучённых хромосом было показано, что многие, по всей видимости, нереципрокные транслокации на молекулярном уровне были на самом деле реципрокными, и частота неполных обменов была очень низкой. Исходя из этого, для ретроспективной оценки дозы предлагается учитывать только общую частоту транслокаций без разделения их на полные — неполные или реципрокные — нереципрокные.

Для статистической обработки полученных результатов (сравнение средних и регрессионный анализ) использовали пакет программ Statistica 6. Критической величиной уровня значимости считали 0,05.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены усреднённые результаты цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови указанных выше трёх здо-



Рис. 1. Нормальная метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й (жёлтые) парами хромосом
Fig. 1. Normal metaphase with FISH-painting 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes

ровых доноров при использовании трёхцветного FISH-окрашивания с помощью ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом. Аналогичные данные приведены в табл. 2 для ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом. На рис. 1 представлена нормальная метафаза при использовании ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом, а на рис. 2 и 3 показаны метафазы с транслокацией между 3-й и контрольно окрашенными хромосомами и между 1-й и 4-й хромосомами соответственно.

Таблица 1

Средние частоты (\pm стандартные ошибки) FISH-окрашенных aberrаций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров в контроле и после гамма-облучения *in vitro* при использовании трёхцветных ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом

Mean frequencies (\pm standard errors) of FISH-painting chromosome aberrations in peripheral blood lymphocyte cultures of three healthy donors in control and after gamma irradiation *in vitro* using three-color DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Общая частота транслокаций на 100 клеток различного типа		Частота инверсий 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	
			Все клетки	Стабильные клетки						Все клетки	Стабильные клетки
0	2953	2944	0,22 \pm 0,11	0,23 \pm 0,12	0	0	0,03 \pm 0,03	0	0,03 \pm 0,03	0,65 \pm 0,33	0,66 \pm 0,34
0,10	2621	2613	0,42 \pm 0,11	0,42 \pm 0,11	0	0	0,03 \pm 0,03	0	0,05 \pm 0,05	1,24 \pm 0,31	1,24 \pm 0,31
0,15	2073	2055	0,39 \pm 0,10	0,39 \pm 0,10	0	0	0,12 \pm 0,08	0	0,13 \pm 0,13	1,13 \pm 0,28	1,14 \pm 0,29
0,25	2279	2252	0,68 \pm 0,12	0,64 \pm 0,14	0	0	0,23 \pm 0,12	0	0,13 \pm 0,08	1,99 \pm 0,36	1,88 \pm 0,39
0,35	1802	1774	0,94 \pm 0,25	0,95 \pm 0,24	0	0	0,32 \pm 0,14	0	0,58 \pm 0,21	2,75 \pm 0,71	2,78 \pm 0,70
0,50	3306	3254	1,30 \pm 0,01	1,27 \pm 0,04	0	0,03 \pm 0,03	0,49 \pm 0,15	0,03 \pm 0,03	0,25 \pm 0,13	3,82 \pm 0,01	3,72 \pm 0,14
0,75	2207	2139	3,04 \pm 0,79	3,05 \pm 0,75	0	0	0,63 \pm 0,16	0,04 \pm 0,04	0,52 \pm 0,27	8,87 \pm 2,28	8,94 \pm 2,18
1,00	2466	2312	3,55 \pm 0,50	3,47 \pm 0,58	0,08 \pm 0,08	0,08 \pm 0,08	1,54 \pm 0,35	0,05 \pm 0,05	1,28 \pm 0,38	10,41 \pm 1,46	10,17 \pm 1,66
1,50	1797	1589	7,72 \pm 0,77	7,56 \pm 0,79	0,08 \pm 0,04	0,18 \pm 0,03	2,86 \pm 0,94	0,12 \pm 0,12	2,05 \pm 0,68	22,74 \pm 2,23	22,29 \pm 2,27
2,00	2217	1823	11,37 \pm 2,00	10,52 \pm 2,26	0,05 \pm 0,03	0,03 \pm 0,03	4,77 \pm 0,82	0,31 \pm 0,21	4,16 \pm 0,48	35,45 \pm 5,60	32,26 \pm 5,13
3,00	1462	900	25,74 \pm 3,06	21,89 \pm 2,16	0,18 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	12,22 \pm 1,64	0,92 \pm 0,13	10,69 \pm 1,50	74,62 \pm 8,79	63,32 \pm 6,02

Примечание: При определении стабильности клеток учитывали не только aberrации по FISH-окрашенным, но и по контрольно окрашенным хромосомам

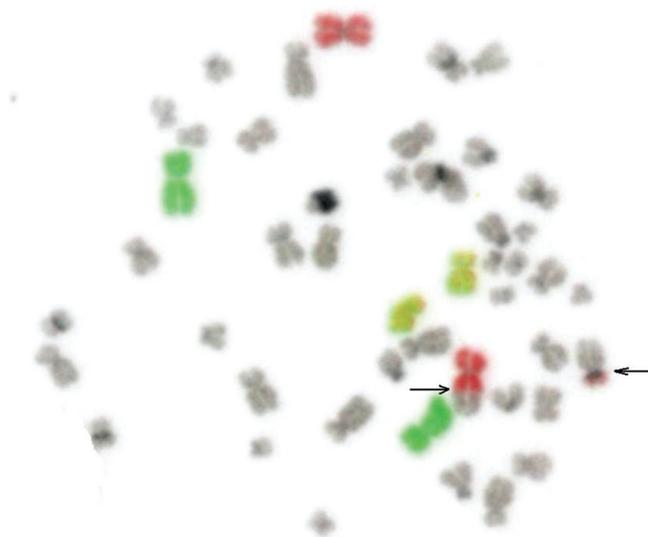


Рис. 2. Метафаза с FISH-окрашенными 2-й (зелёные), 3-й (красные) и 8-й (жёлтые) парами хромосом и транслокацией между 3-й и контрокрашенной хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)
 Fig. 2. Metaphase with FISH-stained 2 (green), 3 (red) and 8 (yellow) pairs of chromosomes and translocation between 3 and counterstained chromosomes (break points are indicated by arrows)

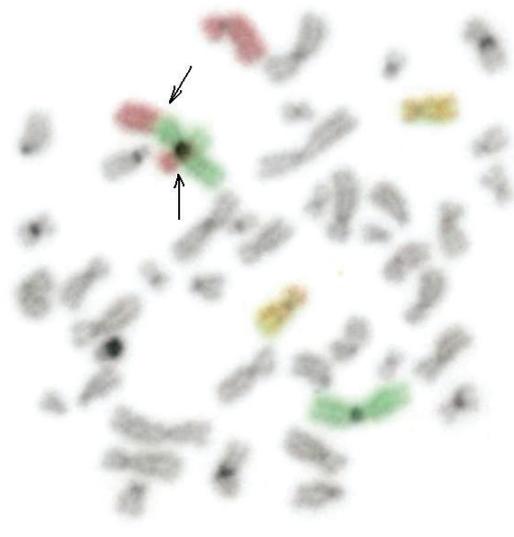


Рис. 3. Метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й (жёлтые) парами хромосом и транслокацией между 1-й и 4-й хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)
 Fig. 3. Metaphase with FISH-stained 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes and translocation between 1 and 4 chromosomes (break points are indicated by arrows)

С помощью *t*-критерия Стьюдента с попарно связанными вариантами было продемонстрировано отсутствие существенных отличий между двумя разными использованными наборами ДНК-зондов при определении фоновых и индуцированных при разных дозах частот транслокаций: уровень значимости *p* вне зависимости от дозы варьировал от 0,124 до 0,928 при

исследовании всех (и нестабильных, и стабильных) клеток. При этом цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток выявлял тенденцию или имел статистическую значимость регистрации более низких уровней aberrаций хромосом, чем при анализе всех клеток, при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр: для набора ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам

Таблица 2

Средние частоты (\pm стандартные ошибки) FISH-окрашенных aberrаций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров в контроле и после гамма-облучения *in vitro* при использовании трёхцветных ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом

Mean frequencies (\pm standard errors) of FISH-stained chromosome aberrations in peripheral blood lymphocyte cultures of three healthy donors in control and after gamma irradiation *in vitro* using three-color DNA probes to 2, 3 and 8 pairs of chromosomes

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Общая частота транслокаций на 100 клеток различного типа		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	
			Все клетки	Стабильные клетки						Все клетки	Стабильные клетки
0	2280	2271	0,03 \pm 0,03	0,03 \pm 0,03	0	0	0	0	0,10 \pm 0,10	0,09 \pm 0,09	0,10 \pm 0,10
0,10	2798	2783	0,47 \pm 0,11	0,47 \pm 0,11	0	0	0,03 \pm 0,03	0	0,27 \pm 0,09	1,31 \pm 0,27	1,31 \pm 0,28
0,15	2117	2102	0,44 \pm 0,09	0,38 \pm 0,12	0	0	0,05 \pm 0,05	0	0,18 \pm 0,11	1,26 \pm 0,25	1,09 \pm 0,36
0,25	2587	2576	0,66 \pm 0,05	0,58 \pm 0,12	0	0,04 \pm 0,04	0,11 \pm 0,06	0	0,16 \pm 0,16	1,90 \pm 0,13	1,67 \pm 0,33
0,35	2368	2332	0,92 \pm 0,07	0,85 \pm 0,11	0	0	0,22 \pm 0,10	0	0,42 \pm 0,14	2,63 \pm 0,22	2,43 \pm 0,33
0,50	3006	2931	1,43 \pm 0,18	1,46 \pm 0,18	0,03 \pm 0,03	0,04 \pm 0,04	0,59 \pm 0,16	0	0,38 \pm 0,19	4,09 \pm 0,49	4,20 \pm 0,50
0,75	2714	2589	2,50 \pm 0,19	2,26 \pm 0,10	0	0	1,13 \pm 0,13	0,14 \pm 0,02	1,02 \pm 0,38	7,19 \pm 0,55	6,49 \pm 0,34
1,00	1750	1636	3,59 \pm 0,60	3,29 \pm 0,45	0,05 \pm 0,05	0,10 \pm 0,05	1,32 \pm 0,21	0,20 \pm 0,10	0,82 \pm 0,21	10,46 \pm 1,82	9,63 \pm 1,36
1,50	2173	1880	6,68 \pm 0,97	5,71 \pm 1,40	0,15 \pm 0,15	0,04 \pm 0,04	4,24 \pm 0,86	0,04 \pm 0,04	2,25 \pm 0,38	20,10 \pm 3,02	17,06 \pm 4,30
2,00	1749	1432	10,92 \pm 2,27	9,06 \pm 2,04	0,11 \pm 0,06	0,41 \pm 0,27	5,28 \pm 1,36	0,46 \pm 0,12	4,25 \pm 0,85	31,92 \pm 5,81	26,98 \pm 4,84
3,00	2100	1256	23,79 \pm 1,33	19,67 \pm 0,70	0,77 \pm 0,34	0,48 \pm 0,10	14,29 \pm 1,30	0,90 \pm 0,20	11,20 \pm 0,63	68,84 \pm 3,08	55,30 \pm 3,08

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

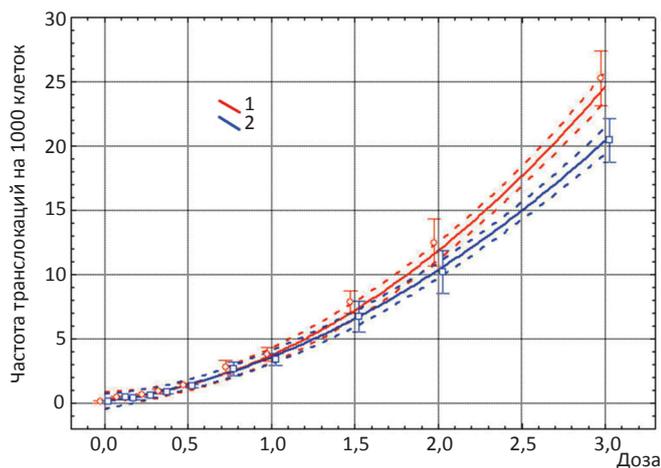


Рис. 4. Графики дозовых зависимостей (сплошные линии) с 95%-доверительными интервалами (пунктирные линии) частот транслокаций, выявленных с помощью трёхцветного FISH-метода для двух наборов ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й и 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом при анализе всех клеток (1 — красные линии) и стабильных клеток (2 — синие линии)
 Fig. 4. Dose relation curves (solid lines) with 95% confidence intervals (dashed lines) of translocation frequencies detected using the three-color FISH method for two sets of DNA probes for 1, 4 and 12 and 2, 3 and 8 chromosome pairs in the analysis of all cells (1 — red lines) and stable cells (2 — blue lines)

хромосом уровни значимости равнялись 0,034 и 0,084, а для набора ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом — 0,070 и 0,040 соответственно.

Данные, полученные при использовании обоих наборов ДНК зондов, были объединены, и с помощью регрессионного анализа по методу наименьших квадратов были получены отдельные линейно-квадратичные дозовые зависимости для частот транслокаций во всех и в стабильных клетках:

$$Y = (0,23 \pm 0,33) + (1,19 \pm 1,69)D + (2,31 \pm 0,24)D^2, \quad (1)$$

где Y — частота транслокаций на 100 всех клеток (нестабильных и стабильных) при использовании обоих наборов ДНК-зондов, D — доза, Гр;

$$Y = (0,12 \pm 0,30) + (1,82 \pm 0,62)D + (1,65 \pm 0,21)D^2, \quad (2)$$

где Y — частота транслокаций на 100 стабильных клеток при использовании обоих наборов ДНК-зондов, D — доза, Гр.

Обе объединённые зависимости доза-эффект представлены графически на рис. 4.

В табл. 3 приведены данные, демонстрирующие относительное (среди выбранных трёхцветных пар хромосом) участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных двуцветных транслокациях с контрокрашенными хромосомами (суммарно независимо от дозы) отдельно для каждого донора и для всех них вместе. Для выявления возможных отличий между донорами с помощью критерия χ^2 было проведено соответствующее сравнение этих частот. Значимое отличие наблюдалось только между донорами 1 и 3 по хромосоме 2. В связи с единичностью указанного события был сделан вывод о его случайности, так как в остальных случаях не было существенных различий между донорами в от-

ношении участия разных пар хромосом в двуцветных FISH-контрокрашенных транслокациях (p варьировало от 0,116 до 1).

При дальнейшей статистической обработке показана существенность большего числа транслокаций с участием пар хромосом $1 > 4 > 12$ ($p < 0,0001$), а также для пар $2 > 8$ и $3 > 8$ ($p < 0,0001$). Только между парами 2 и 3 различия были незначимы ($p = 0,606$). При этом сравнение между эмпирическими и расчётными частотами участия отдельных пар хромосом в транслокациях, исходя из табличных соотношений содержания ДНК в выбранных парах хромосом, показало их примерное совпадение (p варьировало от 0,1110 до 0,6026) (для простоты были использованы сведения, приведенные для мужчин [1]). На основе этих данных был сделан вывод о соответствии вероятности участия отдельных использованных пар хромосом в радиационно-индуцированных транслокациях относительному содержанию в них ДНК. Это соответствует принятой сейчас гипотезе о пропорциональности вероятности индукции двойных разрывов ДНК её относительному содержанию в отдельных парах хромосом [1], хотя имеются работы, где эта точка зрения подвергается критике [5–7]. При этом нет единой точки зрения, какие хромосомы более радиочувствительны, а какие более радиорезистентны. Данное обстоятельство часто связывают с междонорскими различиями.

Таблица 3

Участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных двуцветных транслокациях с контрокрашенными хромосомами (суммарно независимо от дозы) при использовании трёхцветного FISH-метода

Participation of different FISH-stained chromosomes in radiation-induced bicolor translocations with counterstained chromosomes (in total, regardless of the dose) using the three-color FISH method

Транслокации по следующим парам FISH-окрашенных хромосом		Донор 1	Донор 2	Донор 3	Сумма
Набор ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом					
1	Число	135	142	154	431
	Доля, %	50,37	46,71	44,38	46,90
4	Число	79	88	120	287
	Доля, %	29,48	28,95	34,58	31,23
12	Число	54	74	73	201
	Доля, %	20,15	24,34	21,04	21,87
Сумма	Число	268	304	347	919
	Доля, %	100	100	100	100
Набор ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом					
2	Число	131	122	114	367
	Доля, %	41,99	37,65	33,63	37,64
3	Число	103	121	132	356
	Доля, %	33,01	37,35	38,94	36,51
8	Число	78	81	93	252
	Доля, %	25,00	25,00	27,43	25,85
Сумма	Число	312	324	339	975
	Доля, %	100	100	100	100

Исходным принципом получения кривых доза-эффект для частот радиационно-индуцированных транслокаций, регистрируемых FISH-методом, является их построение с помощью регрессионных методов по результатам облучения полученной путём венепункции крови здоровых доноров, как это делалось для уровней дицентриков при использовании классического метода окраски хромосом. В основе такого подхода является давно установленная одинаковая радиочувствительность хромосом лимфоцитов после воздействия на них ионизирующих излучений *in vivo* и *in vitro* [1]. В тех же рекомендациях МАГАТЭ высказано положение о необходимости в каждой лаборатории иметь свои собственные кривые доза-эффект для оценок дозы по FISH-окрашенным транслокациям. При построении этих кривых надо пользоваться тем же самым набором ДНК-зондов, который обычно применяются на практике для обследования реальных случаев возможного переоблучения индивидуумов, чтобы избежать пересчёта при получении оценок частоты геномных транслокаций. Такой подход позволяет устранить возникновение некоторой дополнительной неопределенности, сопутствующей этому процессу [1]. Таким образом, необходимость пересчёта в частоту геномных aberrаций возникает только при сравнении с данными других авторов, пользовавшихся иными наборами ДНК-зондов. Для коррекции экспериментально обнаруженных частот транслокаций к частоте на весь геном пользуются специальными формулами, учитывающими относительное содержание ДНК в соответствующих хромосомах и то, является ли используемый FISH-метод одноцветным, двухцветным или трёхцветным [1]. В табл. 1 и 2 показаны результаты такого пересчёта на основе полученных реальных частот транслокаций.

Имеются различные точки зрения относительно критериев выбора метафаз для цитогенетического анализа FISH-окрашенных препаратов. В идеальном виде подходящими для счёта считаются хорошо распластанные интактные полные метафазы с выраженными центромерами во всех хромосомах и яркой флуорохромной окраской для обнаружения обменов между разноцветными хромосомами [8, 9]. На практике полноту числа контрокрашенных хромосом учитывают с меньшей строгостью, хотя и стараются, чтобы в исследуемой метафазе количество всех хромосом было не меньше 40. При этом FISH-окрашенные пары хромосом должны присутствовать в своём полном объёме (насколько это позволяет разрешение метода) независимо от их участия в тех или иных перестройках [1, 10, 11]. Собственно говоря, в настоящей работе авторы и следовали данному подходу. В принципе показано, что учёт клеток с дефицитом окрашенного материала (например, вследствие делеции) приводит к аномально высокому уровню транслокаций, особенно, когда рассматриваются частоты, близкие к фоновым значениям [12, 13].

На основании результатов цитогенетического анализа препаратов, окрашенных классическим методом и с помощью G-бэндинга, было выдвинуто предположение, что дицентрики и реципрокные транслокации при действии ионизирующей радиации индуцируются с одинаковой частотой, т.е. при обра-

зовании двух разрывов в разных хромосомах образование асимметричного и симметричного обменов является равновероятным [14]. Однако в работах [15, 16] геномная частота транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови 2 доноров-женщин при использовании FISH-окрашенных наборов хромосом была больше, чем частота дицентриков после классической окраски хромосом. Были предложены следующие объяснения этому расхождению: 1) ошибочная идентификация дицентриков в качестве реципрокных транслокаций без использования центромерных FISH-проб [17]; 2) учёт всех транслокаций (реципрокных, терминальных и интерстициальных), а не только реципрокных [14].

В ряде работ необходимость использования центромерных проб для дифференциации транслокаций и дицентриков подвергается сомнению, т.к. для многих метафаз достаточно использовать фильтр контрокраски с целью ясной идентификации центромер [18, 19]. Более того, в статье [20] вообще высказывается мнение, что классическая идентификация центромеры по месту первичной перетяжки более надёжна, чем использование панцентромерных ДНК-проб, т.к. они в действительности метят не саму центромеру, а прицентромерный гетерохроматин. Соответственно, разрыв в этой области может приводить к неправильной классификации транслокаций и дицентриков.

Таким образом, из сказанного выше следует, что сейчас наиболее распространённой является точка зрения об одинаковой вероятности продукции симметричного и асимметричного обмена после индуцирования по одному разрыву в двух хромосомах. Тем более удивительными выглядят полученные нами данные. Как следует из табл. 1 и 2, уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Заметим, что центромеры, как и требуется, были в целом хорошо выражены при использовании фильтра контрокраски DAPI. С этими нашими данными полностью согласуются результаты, полученные в работе [10], также посвящённой построению цитогенетических кривых доза-эффект с помощью трёхцветного FISH-окрашивания после гамма-облучения периферической крови одного донора *in vitro*. В данном исследовании частота двухцветных дицентриков также была ниже уровня FISH-окрашенных транслокаций.

Возникает вопрос, насколько трёхцветное FISH-окрашивание увеличивает чувствительность метода по сравнению с его одноцветным вариантом? Ниже даны формулы, описывающие кривые доза-эффект при учёте всех наблюдаемых транслокаций и при учёте только транслокаций между FISH- и контрокрашенными хромосомами для обоих наборов ДНК-зондов:

$$Y = 0,210 + 1,337D + 2,352D^2, \quad (3)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,221 + 1,109D + 2,276D^2, \quad (4)$$

где Y — частота транслокаций только между FISH- и контрокрашенными хромосомами на 100 клеток (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,254 + 1,050D + 2,272D^2, \quad (5)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,238 + 0,819D + 2,139D^2, \quad (6)$$

где Y — частота транслокаций только между FISH- и контрокрашенными хромосомами на 100 клеток (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом), D — доза, Гр.

Процедура вычитания показателей одной кривой из показателей другой даёт следующие зависимости только для транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом:

$$Y = -0,011 + 0,228D + 0,076D^2 \text{ (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом)} \quad (7)$$

$$Y = 0,016 + 0,231D + 0,132D^2 \text{ (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом)}. \quad (8)$$

Таким образом, количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом оказывается очень низким, что не способствует увеличению чувствительности FISH-метода ретроспективной оценки дозы по сравнению с его одноцветным вариантом.

В течение многих лет хромосомные обмены, включая транслокации, рассматривались как результат взаимодействия только двух хромосом [2]. Однако в последнее время было показано, что сложные аберрации, при образовании которых происходит три или более разрывов в двух или более хромосомах [1], оказываются достаточно распространёнными. Частота их появления и сложность увеличивается с дозой, особенно, при её уровнях более 2 Гр [21], но и при дозах менее 1 Гр и даже в необлучённых контролях они могут встречаться. Сложные обмены имеют практическим следствием усложнение биологической индикации дозы. То, что выглядело довольно простым процессом подсчета дицентриков или транслокаций, стало гораздо более сложным, так как исследователи столкнулись с важностью трактовки трехсторонних и более высокого уровня обменов по отношению к двухсторонним обменам. Было высказано мнение, что сложный характер реципрокных транслокаций может в отдалённый период приводить к их элиминации вследствие возникающего генетического дисбаланса при делении клеток и к соответствующему занижению ретроспективной оценки дозы [22]. К счастью, при низких дозах доля всех сложных обменов сравнительно невелика, но, по мнению, высказанному в статье [3], всё-таки не достаточно низка, чтобы полностью их игнорировать. В данной работе сложные транслокации были переведены в эквивалентное число простых транслокаций, основываясь на количестве разноцветных сочленений, как это было сделано в исследованиях [5, 6].

В то же время трёхцветный FISH-метод позволил зарегистрировать редкие, но интересные перестройки, включающие больше двух хромосом, которые не могли быть выявлены с помощью одноцветного FISH, хотя с формальной точки зрения они и не относятся к категории сложных транслокаций. Например, была обнаружена клетка (после облучения крови *in vitro* в дозе 0,35 Гр), в которой наблюдался обмен «по кругу» дистальными участками между тремя хромосомами: 1-й, 4-й и контрокрашенной, когда часть хромосомы 1 присоединилась к хромосоме 4, часть хромосомы 4 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 1 (рис. 5). В другой метафазе (после облучения в дозе 2,0 Гр) наблюдался аналогичный обмен дистальными участками между другими тремя хромосомами: 3-й, 8-й и контрокрашенной, т.е. часть хромосомы 3 присоединилась к хромосоме 8, часть хромосомы 8 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к 3-й хромосоме. В другой метафазе (после облучения крови *in vitro* в дозе 0,35 Гр) наблюдался аналогичный обмен дистальными участками между другими тремя хромосомами: 1, 4 и контрокрашенной, когда часть хромосомы 1 присоединилась к хромосоме 4, часть хромосомы 4 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 1. Встречались и другие клетки с подобными перестройками. В этих случаях происходит три разрыва в трёх хромосомах, что может быть зарегистрировано только при рассматриваемом трёхцветном FISH-методе. Возникает вопрос: сколько же транслокаций имеется

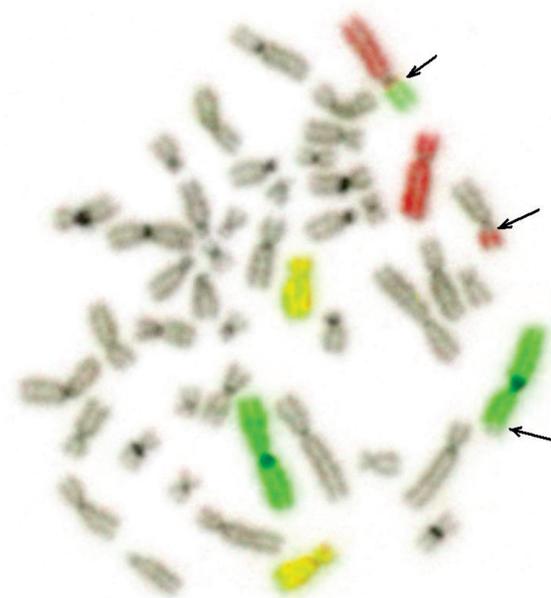


Рис. 5. Метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й-й (жёлтые) парами хромосом и последовательными транслокациями между 1, 4-й и контрокрашенной хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)

Fig. 5. Metaphase with FISH-stained 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes and sequential translocations between 1, 4 and counterstained chromosomes (break points are indicated by arrows)

в этих ситуациях? Действительно, при одной обычной транслокации происходит два разрыва в двух хромосомах, при двух независимых транслокациях — четыре разрыва в четырёх хромосомах. Поэтому мы посчитали возможным обозначить обнаруженный феномен как парадоксальным числом 1,5 транслокации, хотя в статье [10] авторы предлагают считать, что имеется 2 транслокации.

В рекомендациях МАГАТЭ [1] указывается, что хотя в настоящее время ретроспективное восстановление дозы по частоте транслокаций в стабильных клетках является общепринятым методом, однако имеются ограничения. По-видимому, это хороший подход для случаев пролонгированного облучения в низкой дозе при преобладании в уравнении дозовой зависимости линейного члена. После облучения в высокой острой дозе ограничение анализа лишь стабильными клетками может приводить к недооценке её величины, т.к. количество транслокаций в нестабильных клетках возрастает вместе с числом сложных aberrаций, да и частота клеток, не содержащих нестабильные перестройки хромосом, при росте дозы становится всё меньше и меньше. Таким образом, использование одной из двух кривых, представленных на рис. 1, оказывается вопросом выбора в каждом отдельном случае.

Необходимо также отметить, что в нашем исследовании после облучения *in vitro* при дозах более 1 Гр наблюдалась в целом (хотя бы и в виде тенденции) более высокая частота транслокаций во всех клетках по сравнению с их регистрацией в только стабильных клетках, что несколько удивительно и пока не объяснимо. С нашей точки зрения, более логичной выглядела бы другая ситуация, исходя из индуцированного количества разрывов, реализующихся в виде стабиль-

ных или нестабильных хромосомных aberrаций. В работе [11] после облучения *in vitro* частоты простых транслокаций в стабильных и нестабильных клетках не различались, но и верхняя дозовая граница составляла 1 Гр.

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования были получены кривые доза-эффект для транслокаций. Они были построены по результатам цитогенетического анализа с помощью трёхцветного FISH-метода культур лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров после γ -облучения *in vitro* в дозах от 0,1 до 3 Гр. При этом использовались два разных набора ДНК-зондов к 1-й, 4-й, 12-й и 2-й, 3-й, 8-й парам хромосом. Суммарное относительное содержание ДНК в этих выбранных группах хромосом практически не отличается друг от друга. Схожими оказались и полученные кривые доза-эффект. При этом цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр выявлял тенденцию к регистрации более низких уровней транслокаций, чем при анализе всех клеток (нестабильных и стабильных). Уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом в целом оказался очень низким, что явно не способствует увеличению чувствительности FISH-метода ретроспективной оценки дозы по сравнению с его одноцветным вариантом. В то же время трёхцветная FISH-окраска позволяет выявлять такие варианты хромосомных перестроек, которые не регистрируются с помощью одноцветного FISH-метода.

Three-Color FISH Method: Dose-Effect Curves for Translocations in Peripheral Blood Lymphocyte Cultures after Gamma-Irradiation *in vitro*

V.Yu. Nugis¹, G.P. Snigiryova², E.E. Lomonosova¹, M.G. Kozlova¹, V.A. Nikitina¹

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

E-mail: nugisvju@list.ru

ABSTRACT

Purpose: Plotting dose-effect curves for translocations identified using the tricolor FISH method based on the results of cytogenetic analysis of cultures of peripheral blood lymphocytes of healthy donors after *in vitro* gamma irradiation.

Material and methods: Venous blood was obtained from three donors (2 men and 1 woman aged from 28 to 41 years) and subjected to *in vitro* gamma irradiation from a ⁶⁰Co source at doses of 0.10; 0.15; 0.25; 0.35; 0.50; 0.75; 1.00; 1.50; 2.00 and 3.00 Gy at 37 °C (dose rate 0.5 Gy / min). For tricolor FISH staining, two different sets of DNA probes were used for chromosome pairs 1, 4, 12 and 2, 3, 8. Metaphases with a quasi-diploid number of chromosomes (40–46) and a complete set of all FISH-stained chromosomes, taking into account their total length, were selected for analysis. Differentiation of stable and unstable cells was also carried out. In the cytogenetic analysis, traditional terminology was used with the designation of translocations as reciprocal (complete, two-sided), non-reciprocal (terminal, incomplete, or unilateral), or interstitial.

Results: The obtained numerical data were used to compare the statistically frequencies of FISH-recorded translocations when using different sets of DNA probes, when calculating of chromosome aberrations were in all (unstable and stable) and stable metaphase cells, when comparing of the frequencies of FISH-recorded translocations and dicentrics, and assessing of the contribution of the level of translocations between FISH-stained chromosome pairs in the total translocation frequency. Cytogenetic analysis of only stable metaphase cells revealed a tendency to register lower levels of translocations than when analyzing all cells (unstable and stable), at the highest doses of 2 and 3 Gy. The levels of dicentrics formed with the participation of FISH-stained chromosomes were significantly lower than the number of observed translocations. The quantitative contribution of translocations between FISH-stained pairs of chromosomes turned out to be very low, which clearly does not contribute to an increase in the sensitivity of the FISH method of retrospective dose estimation as compared to its one-color version. At the

same time, the three-color FISH-staining makes it possible to identify such variants of chromosomal rearrangements that are not recorded using the one-color FISH method.

Conclusion: The plotted dose-effect curves generally corresponded to the linear-quadratic form. Dose dependences obtained for translocations using two different selected tricolor sets of DNA probes did not differ statistically significantly.

Key words: *peripheral blood, lymphocytes culture, gamma-irradiation in vitro, three-color FISH method, translocations, dose-effect curves*

For citation: Nugis VYu, Snigiryova GP, Lomonosova EE, Kozlova MG, Nikitina VA. 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;65(5):12-20 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
2. Tucker JD. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2008;659(3):211-20. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.04.001.
3. Kodama Y, Nakano M, Ohtaki K, Delongchamp R, Awa AA, Nakamura N. Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol.* 1997;71(1):35-9. DOI: 10.1080/095530097144391.
4. Boei JJWA, Natarajan AT. Combined use of a chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations. *Int J Radiat Biol.* 1998;73(2):125-33. DOI: 10.1080/095530098142491.
5. Pouzoulet F, Roch-Lefevre S, Giraudet Al, Vaurijoux A, Voisin Pa, Buard V, et al. Monitoring translocations by m-FISH and three-color FISH painting techniques: a study of two radiotherapy patients. *J Radiat Res.* 2007;48(5):425-34. DOI: 10.1269/jrr.07013.
6. Ramadhani D, Purnami S, Yoshida M. Comparison of radiosensitivity of human chromosomes 1, 2 and 4 from one healthy donor. *Atom Indonesia.* 2006;42(2):71-7. DOI: 10.17146/aij.2016.505.
7. Sommer S, Buraczewska I, Wojewodzka M, Bouzyk E, Szumił I, Wojcik A. The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors. *Int J Radiat Biol.* 2005;81(10):741-9. DOI: 10.1080/09553000500499381.
8. Sigurdson AJ, Ha M, Hauptmann M, Bhatti P, Sram RJ, Beskid O, et al. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat Res.* 2008;652(2):112-21. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.01.005.
9. Liu Q-J, Lu X, Zhao X-T, Feng J-B, Lü Yu-M, Jiang En-H, 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;759:1-8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.07.016.
10. 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 Environ Mutagenesis.* 2015;794:32-8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.002.
11. Goh VST, Fujishima Y, Abe Y, Sakai A, Yoshida MA, Ariyoshi K, et al. Construction of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) translocation dose-response calibration curve with multiple donor data sets using R, based on ISO 20046:2019 recommendations. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(12):1668-84. DOI: 10.1080/09553002.2019.1664788.
12. Edwards AA, Maznik N, Moquet J, P. Hone; Vinnikov V, Lloyd D, Cox R. Choosing metaphases for biological dosimetry by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Radiat Res.* 2002;157(4):469-71. DOI: 10.1667/0033-7587(2002)157[0469:CMFBDB]2.0.CO;2.
13. Lloyd DC, Lucas JN, Edwards AA, Deng W, Valente E, Hone PA, Moquet JE. A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations of Namibian uranium miners. *Radiat Res.* 2001;155(6):809-17. DOI: 10.1667/0033-7587(2001)155[0809:astvar]2.0.CO;2.
14. Natarajan AT, Balajee AS, Boei JJWA, Darroudi F, Dominguez I, Hande MP, et al. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat Res.* 1996;372(2):247-58. DOI: 10.1016/s0027-5107(96)00144-3.
15. Natarajan AT, Vyas RC, Darroudi F, Vermeulen F. Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int J Radiat Biol.* 1992;61(2):11-8. DOI: 10.1080/09553009214550821.
16. Lucas J, Tenjin T, Straume T, Pinkel D, Moore II D, Litt M, et al. Rapid determination of human chromosome translocation frequency using a pair of chromosome-specific DNA probes. *Int J Radiat Biol.* 1989;56(1):35-44. DOI: 10.1080/09553008914551161.
17. Straume T, Lucas JN. A comparison of the yields of translocations and dicentric chromosomes measured using fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol.* 1993;64(2):185-7. DOI: 10.1080/09553009314551281.
18. Tucker JD, Lee DA, Moore II DH. Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol.* 1995;67(1):19-28. DOI: 10.1080/09553009514550031.
19. Sorokine-Durm I, Durand V, Delbos M, Le Baron L, Roy L, Voisin P. A french view on FISH painting as a biodosimeter. *Radiat Protect Dosimetry.* 2000;88(1):35-44. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033017.
20. Tucker JD. Evaluation of chromosome translocations by FISH for radiation biodosimetry: a view from one laboratory. *Radiat Protect Dosimetry.* 2000;88(1):87-92. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033025.
21. Tucker JD, Ramsey MJ, Lee DA, Minkler JL. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral blood lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol.* 1993;64(1):127-37. DOI: 10.1080/09553009314551081.
22. Savage JRK, Papworth DG, Bauchinger M, Natarajan AT, Pantelias GE, Griffin CS, et al. Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction. *Radiat Protect Dosimetry.* 2000;88(1):69-76. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033022.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

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

Поступила: 28.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 28.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Nugis V.Yu. <http://orcid.org/0000-0001-7396-0246>.

Snigiryova G.P. <https://orcid.org/0000-0002-2584-802X>.

Lomonosova E.E. <https://orcid.org/0000-0003-3739-4261>.

Kozlova M.G. <http://orcid.org/0000-0001-8159-0513>.

Nikitina V.A. <http://orcid.org/0000-0002-3150-7686>.