DOI: 10.21870/0131-3878-2016-25-3-104-113

Идентификация маркеров профессионального сочетанного облучения молекулярно-цитогенетическим методом mFISH

Сотник Н.В., Азизова Т.В.

ФГУП Южно-Уральский институт биофизики ФМБА России, Озёрск

Целью настоящего исследования являлся анализ структурных повреждений хромосом у работников ПО «Маяк», подвергшихся профессиональному сочетанному облучению с помощью современного молекулярно-цитогенетического метода mFISH. Анализ хромосомных препаратов показал, что частота стабильных хромосомных aberrаций в группе работников, подвергшихся внешнему гамма-облучению в суммарной поглощённой дозе в красном костном мозге (ККМ) более 0,2 Гр, была статистически значимо выше по сравнению с частотой стабильных хромосомных aberrаций в группе работников, подвергшихся облучению в дозе менее 0,2 Гр, за счёт повышенной частоты транслокаций – биологических маркеров внешнего облучения. В группе работников с содержанием ^{239}Pu в организме более 1,48 кБк частота стабильных хромосомных aberrаций была статистически значимо выше за счёт значительного числа клеток со сложными хромосомными перестройками. Установлены линейные зависимости частоты транслокаций от поглощённой дозы внешнего гамма-излучения в ККМ и частоты сложных хромосомных перестроек от содержания ^{239}Pu в организме. Показано, что частота хромосомных aberrаций (транслокаций и сложных хромосомных перестроек), выявляемых с помощью метода mFISH, является эффективным биологическим индикатором сочетанного облучения.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, работники ПО «Маяк», сочетанное облучение, ^{239}Pu , внешнее гамма-облучение, внутреннее альфа-облучение, mFISH, транслокации, сложные хромосомные перестройки, биоиндикация.

Введение

На протяжении многих лет хромосомные aberrации считаются чувствительным биологическим индикатором повреждения генома при действии ионизирующего излучения. Показано, что дицентрики и транслокации являются биологическим маркером внешнего облучения [1]. В то же время исследования о влиянии внутреннего альфа-излучения на геном человека немногочисленны и противоречивы, причём большинство из них являются экспериментальными исследованиями *in vitro* [2-8]. В доступной литературе практически отсутствуют данные о вкладе внутреннего и внешнего облучения в формирование радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций при пролонгированном сочетанном облучении.

Ранее для выявления хромосомных aberrаций использовали препараты метафазных хромосом, окрашенных красителем Романовского-Гимза (рутинный метод) или дифференциально-окрашенных. В настоящее время для выявления хромосомных нарушений широко используется молекулярно-генетический метод FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и его модификации (mFISH и mBAND), позволяющий окрашивать и визуализировать отдельные хромосомы или участки хромосом в пределах одной метафазной пластинки [9, 10]. При использовании FISH окрашивания хромосомных препаратов структурные нарушения легко распознаются, что значительно увеличивает скорость анализа, а с помощью методов mFISH и mBAND стало возможным выявление сложных хромосомных перестроек и внутрихромосомных aberrаций.

Сотник Н.В. – рук. группы; Азизова Т.В.* – зам. директора по науке, зав. отд., к.м.н. ФГУП ЮУриБФ ФМБА России.
*Контакты: 456780, Челябинская обл., Озёрск, Озерское шоссе, д. 19; Тел.: 8 (35130) 2-91-90; e-mail: clinic@subi.su.

Целью настоящего исследования являлась оценка спектра и частоты хромосомных aberrаций у работников ПО «Маяк», подвергшихся профессиональному сочетанному облучению, с помощью современного молекулярно-цитогенетического метода mFISH.

Материалы и методы

Изучаемой группой являлась группа работников ПО «Маяк», подвергшихся профессиональному хроническому внутреннему альфа-облучению от инкорпорированного ^{239}Pu и/или внешнему гамма-облучению. В настоящем исследовании были проанализированы хромосомные препараты 154 работников ПО «Маяк» (93 мужчин и 61 женщины), средний возраст которых составил $75,0 \pm 7,6$ лет. Большая часть обследованных работников (79,9%) подверглись сочетанному облучению. Содержание ^{239}Pu в организме работников, включённых в исследование, составила 0-15,9 кБк; суммарная поглощённая доза внутреннего альфа-излучения в красном костном мозге (ККМ) от инкорпорированного ^{239}Pu находилась в диапазоне от 0 до 0,9 Гр; суммарная поглощённая доза внешнего гамма-излучения в ККМ составила 0-3,2 Гр.

Для формирования контрольной группы к исследованию было привлечено 46 жителей г. Озерска (17 мужчин и 29 женщин), постоянно проживающих в городе, не имевших профессионального контакта с источниками ионизирующих излучений, никогда не участвовавших в ликвидации последствий радиационных аварий и никогда не проживавших на радиоактивно загрязнённых территориях. Средний возраст лиц контрольной группы составил $74,6 \pm 9,4$ года.

Взятие образцов крови, культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление хромосомных препаратов проводили согласно протоколу, описанному ранее [11], после подписания «Информированного согласия» и «Согласия на обработку персональных данных». Гибридизацию хромосомных препаратов для проведения анализа с помощью метода mFISH осуществляли по методике 24XCyte lab manual, рекомендованной компанией-производителем (MetaSystems).

Захват изображений метафазных разбросов и кариотипирование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z.2 (Carl Zeiss) с использованием набора фильтров DAPI, FITC, Texas Red, Spectrum Orange, DEAC, Cy5 и программного обеспечения ISIS4 (Metasystems). Для каждого участника исследования анализировали 100-250 метафазных разбросов. Количество aberrаций оценивали на 100 проанализированных метафаз.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных методов биостатистики и регрессионного анализа.

Результаты и обсуждение

В результате цитогенетического обследования в исследуемых группах было проанализировано 24953 метафазных разбросов. При анализе хромосомных препаратов с помощью метода mFISH у работников ПО «Маяк» были зарегистрированы как стабильные (транслокации, инсерции, терминальные делеции), так и нестабильные хромосомные aberrации (дицентрические хромосомы), а также клетки со сложными хромосомными перестройками (как стабильные, так и нестабильные), в то время как у лиц контрольной группы были выявлены только стабильные хромосомные aberrации (транслокации).

При сравнении частоты хромосомных aberrаций в изучаемых группах было установлено, что частота всех хромосомных aberrаций (как стабильных, так и нестабильных) у работников ПО «Маяк», подвергшихся профессиональному пролонгированному облучению, была статистически значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с частотой хромосомных aberrаций в контрольной группе ($4,56 \pm 0,22$ и $1,83 \pm 0,22$ соответственно). Полученные результаты подтверждают факт, что частота хромосомных aberrаций в облучённой популяции значительно превышает спонтанный уровень и может быть использована в качестве биологического маркера облучения, а также при оценке дозы облучения спустя длительное время после радиационного воздействия, в том числе в случае пролонгированного облучения [1].

В структуре стабильных aberrаций у работников, подвергшихся профессиональному пролонгированному облучению, и у лиц контрольной группы преобладали транслокации (79,4% и 65,1% соответственно), причём частота транслокаций была статистически значимо выше в основной группе по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Частота транслокаций в группе работников ПО «Маяк» составила $3,21 \pm 0,17$ на 100 клеток, у лиц контрольной группы – $0,97 \pm 0,14$ на 100 клеток. Статистически значимых различий в частоте транслокаций между мужчинами и женщинами контрольной группы не было установлено ($1,18 \pm 0,25$ и $0,84 \pm 0,17$ соответственно), что согласуется с данными исследования [12], в котором показано, что частота транслокаций у мужчин и женщин в необлучённой популяции статистически значимо не отличалась.

Частота транслокаций, выявляемых с помощью метода FISH, зависит от ряда факторов, в том числе от возраста обследованных лиц, количества проанализированных метафазных клеток, дозы облучения и т.д. [1]. Ранее считалось, что чувствительность метода FISH ограничена суммарной дозой внешнего гамма-излучения 500 мГр [13]. Но уже в исследовании [14] было показано, что для молодых, некурящих лиц минимальный дозовый порог может быть снижен до 200 мГр. Исследование [15] также показало, что в отличие от индивидуальных оценок доз с помощью метода FISH, для когортных исследований дозовый порог также может быть снижен. В связи с этим, дальнейший анализ частоты транслокаций в группе работников ПО «Маяк» был проведён с учётом суммарной поглощённой дозы внешнего гамма-излучения в ККМ.

Частота транслокаций в группе работников, подвергшихся внешнему гамма-облучению в суммарной поглощённой дозе в красном костном мозге более 0,2 Гр ($3,40 \pm 0,18$), была статистически значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с частотой транслокаций в группе работников, подвергшихся внешнему гамма-облучению в суммарной поглощённой дозе в ККМ менее 0,2 Гр ($2,05 \pm 0,41$). Установлена статистически значимая линейная зависимость частоты транслокаций от суммарной поглощённой дозы внешнего гамма-излучения в ККМ, представленная на рис. 1.

В уравнении регрессии свободный член a , определяющий фоновую (возрастную) зависимость частоты транслокаций в основной группе, равен 1,85, что хорошо согласуется с данными международного исследования [12], в котором частота транслокаций в возрастной группе 75-79 лет составила 1,71 (95% доверительный интервал 1,36-2,14). В целом, полученные данные подтверждают результаты других исследований, в которых показано, что транслокации являются биологическим маркером внешнего облучения и могут быть использованы для ретроспективной оценки доз внешнего облучения [1].

В связи с тем, что 79% обследованных работников ПО «Маяк» подверглись сочетанному облучению (как внешнему, так и внутреннему в широком диапазоне доз), был проанализирован спектр и частота хромосомных aberrаций у работников ПО «Маяк» в зависимости от содержания ^{239}Pu в организме.

Установлено, что в группе работников с содержанием ^{239}Pu в организме более 1,48 кБк частота хромосомных aberrаций как стабильных, так и нестабильных, была статистически значимо выше по сравнению с частотой хромосомных aberrаций в группе работников с содержанием ^{239}Pu в организме менее 1,48 кБк (табл. 1).

Рис. 1. Зависимость частоты транслокаций от поглощённой дозы внешнего гамма-излучения в ККМ.

Таблица 1
Частота хромосомных aberrаций в зависимости от содержания ^{239}Pu в организме

Содержание ^{239}Pu в организме, кБк	Аберрации хромосомного типа на 100 клеток		
	всего	стабильные аберрации	нестабильные аберрации
Менее 1,48 кБк	$4,12 \pm 0,22$	$3,74 \pm 0,21$	$0,012 \pm 0,01$
Более 1,48 кБк	$5,52 \pm 0,48^*$	$4,81 \pm 0,40^*$	$0,14 \pm 0,06^*$

Примечание: * – статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

Нестабильные aberrации у работников ПО «Маяк» с содержанием ^{239}Pu в организме более 1,48 кБк были представлены дицентриками. Установлено, что все обнаруженные дицентрики в данной группе являлись частью сложных aberrаций. К сложным хромосомным перестройкам относили aberrации, являющиеся результатом трёх или более разрывов в двух или более хромосомах. Согласно литературным данным повышение частоты дицентриков было выявлено при исследовании образцов крови у работников Рокки Флэтс (Колорадо, США) при ингаляционном поступлении аэрозолей ^{239}Pu [4]. Сходные результаты были получены при оценке хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови работников ПО «Маяк»: общее количество aberrаций и количество дицентрических хромосом зависело от поглощённой дозы внут-

ренного альфа-излучения в красном костном мозге от инкорпорированного ^{239}Pu [6]. После облучения *in vitro* лимфоцитов периферической крови здоровых доноров ^{213}Bi было показано, что большинство нестабильных aberrаций (в частности, дицентрики) являлись частью сложных aberrаций [7]. Недавнее исследование с помощью метода mFISH лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, облучённых ^{239}Pu *in vitro*, показало, что большинство aberrантных клеток (91%) содержит множественные хромосомные перестройки, состоящие из полицентрических, кольцевых хромосом и ацентрических фрагментов [8].

В настоящем исследовании детальный анализ спектра хромосомных aberrаций в основной группе показал, что значительная часть зарегистрированных aberrаций в группе работников с содержанием ^{239}Pu в организме более 1,48 кБк была представлена сложными хромосомными перестройками. В дальнейший анализ не были включены клетки со сложными хромосомными перестройками, содержащие дицентрические хромосомы, т.к. они являются нестабильными и достаточно быстро элиминируются. К стабильным сложным хромосомным перестройкам также относили инсерции, т.к. их можно считать результатом интерстициальной делеции и последующей встройки в другую хромосому или хромосомный участок [3]. Частота стабильных сложных хромосомных aberrаций у лиц с содержанием ^{239}Pu в организме более 1,48 кБк ($0,86 \pm 0,17$ на 100 клеток) была статистически значимо выше по сравнению с частотой сложных хромосомных aberrаций у работников с содержанием ^{239}Pu в организме менее 1,48 кБк ($0,15 \pm 0,04$ на 100 клеток).

На рис. 2 представлена линейная зависимость частоты сложных хромосомных перестроек от содержания ^{239}Pu в организме с 95% доверительными границами.

Рис. 2. Зависимость частоты сложных хромосомных перестроек от содержания ^{239}Pu в организме.

Следует отметить, что коэффициент корреляции сложных перестроек с содержанием ^{239}Pu в организме был статистически значим и составил 0,68. Также была установлена статистически значимая корреляция частоты сложных хромосомных перестроек с суммарной поглощённой дозой внутреннего альфа-излучения в ККМ, лёгких и печени (коэффициенты корреляции составили 0,57, 0,66 и 0,54 соответственно). Статистически значимой зависимости частоты сложных хромосомных перестроек от поглощённой дозы внешнего гамма-излучения в ККМ не обнаружено ($r=-0,04$).

Полученные результаты можно объяснить тем, что плотноионизирующее излучение приводит к значительному повреждению ДНК и хромосом и, следовательно, с большей вероятностью может вызывать повреждение генов репарации и репликации ДНК, что в свою очередь приводит к возникновению клеток с множественными хромосомными aberrациями. Эти результаты подтверждаются многочисленными исследованиями по анализу структурных повреждений генома при внутреннем облучении [2-8, 11, 16, 17]. Согласно данным литературных источников [2, 4, 5], в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидуумов, облучённых источниками плотноионизирующей радиации *in vitro*, было обнаружено повышение частоты сложных хромосомных aberrаций. Например, в работе [4] при использовании одноцветного FISH-метода для двух пар хромосом в лимфоцитах периферической крови, облучённых ^{238}Pu , было установлено, что 25% хромосомных перестроек являлись сложными. При окрашивании трёх пар хромосом в клетках, облучённых ^{241}Am , сложными являлись 34% всех перестроек [5]. Исследование [2], выполненное с помощью простого FISH метода, показало, что частота сложных хромосомных перестроек после облучения лимфоцитов ^{213}Bi повышалась от 56% при облучении в дозе 0,01 Гр до 89% при увеличении дозы облучения до 0,5 Гр.

В зависимости от целей цитогенетического исследования используются различные методы окрашивания хромосом. До недавнего времени для выявления хромосомных aberrаций использовали препараты метафазных хромосом, окрашенных красителем Романовского-Гимза (рутинный метод) или дифференциально-окрашенных. Рутинная окраска являлась первым методом, который начали использовать в цитогенетике человека с 1959 г. Этот метод до сих пор используется в радиобиологии для анализа дицентриков. Однако применение рутинного метода окрашивания хромосом для подсчёта транслокаций не эффективно, т.к. рутинный метод не позволяет идентифицировать разные морфологически сходные хромосомы набора и внутрихромосомные перестройки. Дифференциальная окраска хромосом используется с 1970 г., в основном, для целей медицинской генетики.

Появление FISH-метода окрашивания хромосом и его модификаций привело к развитию ретроспективной биологической дозиметрии, которая может предоставить оценку дозы облучения, независимую от традиционной физической дозиметрии [1]. Несмотря на ряд преимуществ по сравнению с рутинным и дифференциальными методами окрашивания, метод FISH имеет ряд ограничений, т.к. он позволяет идентифицировать только часть aberrантных хромосом и основывается на экстраполяции абсолютных частот на весь геном. Особое значение это ограничение имеет при установлении происхождения и оценке частоты возникновения сложных хромосомных перестроек. Например, при анализе с помощью простого FISH метода в работе [2] обнаружили, что из всех хромосомных aberrаций, индуцированных альфа-частицами ^{238}Pu в дозе 0,5 Гр, 49%-56% всех перестроек были сложными. При последующем исследовании с по-

мощью метода mFISH частота сложных хромосомных перестроек увеличилась до 83% [3]. Исследование с помощью метода mFISH фибробластов человека, облучённых плотноионизирующей радиацией *in vitro*, показало повышенную частоту сложных хромосомных перестроек [18]. В то же время анализ хромосомных препаратов лиц этой же группы с использованием двух- или трёхцветного FISH не подтвердил это наблюдение [19]. Результаты настоящего и предыдущих собственных исследований [11] также показали, что метод mFISH обладает высокой разрешающей способностью, позволяет регистрировать мелкие перестройки хромосом, неидентифицируемые другими методами, и, как следствие, является наиболее подходящим для биоиндикации сочетанного облучения, т.к. он выявляет как маркеры внутреннего альфа-облучения (сложные хромосомные aberrации), так и внешнего гамма-облучения (транслокации).

Заключение

Таким образом, анализ частоты хромосомных aberrаций, проведённый с помощью современного молекулярно-цитогенетического метода mFISH, выявил статистически значимое повышение частоты транслокаций и сложных хромосомных перестроек в группе работников ПО «Маяк», подвергшихся сочетанному облучению. Результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод, что в случае чрезвычайных радиационных ситуаций, при отсутствии физической дозиметрии, данных о виде излучения, при использовании метода mFISH по частоте транслокаций можно реконструировать дозу внешнего гамма-облучения, а наличие сложных хромосомных перестроек в лимфоцитах периферической крови будет свидетельствовать о факте внутреннего альфа-облучения.

Литература

1. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 247 p.
2. **Anderson R.M., Marsden S.J., Wright E.G., Kadhim M.A., Goodhead D.T., Griffin C.S.** Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles //Int. J. Radiat. Biol. 2000. V. 76, N 1. P. 31-42.
3. **Anderson R.M., Marsden S.J., Paice S.J., Bristoe A.E., Kadhim M.A., Griffin C.S., Goodhead D.T.** Transmissible and non-transmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles //Radiat. Res. 2003. V. 159, N 1. P. 40-48.
4. **Moquet J.E., Fernandez J.L., Edwards A.A., Lloyd D.C.** Lymphocyte chromosomal aberrations and their complexity induced in vitro by plutonium-239 alpha-particles and detected by FISH //Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). 2001. V. 47, N 3. P. 549-556.
5. **Barquinero F., Stephan G., Schmid E.** Effect of americium-241 α -particles on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization //Int. J. Radiat. Biol. 2004. V. 80, N 2. P. 155-164.
6. **Окладникова Н.Д., Осовец С.В., Кудрявцева Т.И.** ^{239}Pu и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови человека //Радиаци. биол. Радиоэкол. 2009. Т. 49, № 4. С. 407-411.
7. **Tawn E.J., Whitehouse C.A.** Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with *in vivo* exposure to plutonium //J. Radiol. Prot. 2005. V. 25, N 1. P. 83-88.
8. **Curwen G.B., Tawn E.J., Cadwell K.K., Guyatt L., Thompson J., Hill M.A.** mFISH analysis of chromosome aberrations induced in vitro by α -particle radiation: examination of dose-response relationships //Radiat. Res. 2012. V. 178, N 5. P. 414-424.
9. **Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C.** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH //Nat. Genet. 1996. V. 12, N 4. P. 368-375.
10. **Chudoba I., Plesch A., Lorch T., Claussen U., Senger G.** High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes //Cytogenet. Cell. genet. 1999. V. 84, N 3-4. P. 156-160.
11. **Sotnik N.V., Osovets S.V., Scherthan H., Azizova T.V.** mFISH analysis of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to mixed radiation //Radiat. Environ. Biophys. 2014. V. 53, N 2. P. 347-354.
12. **Sigurdson A., Ha M., Hauptmann M., Bhatti P., Sram R.J., Beskid O., Tawn E.J., Whitehouse C.A., Lindholm C., Nakano M., Kodama Y., Nakamura N., Vorobtsova I., Oestreicher U., Stephan G., Yong L.C., Bauchinger M., Schmid E., Chung H.W., Darroudi F., Roy L., Voisin P., Barquinero J.F., Livingston G., Blakey D., Hayata I., Zhang W., Wang C., Bennett L.M., Littlefield L.G., Edwards A.A., Kleinerman R.A., Tucker J.D.** International study of factors affecting human chromosome translocations //Mutat. Res. 2008. V. 652, N 2. P. 112-121.
13. **Ainsbury E.A., Bakhanova E., Barquinero J.F., Brai M., Chumak V., Correcher V., Darroudi F., Fattibene P., Gruel G., Guclu I., Horn S., Jaworska A., Kulka U., Lindholm C., Lloyd D., Longo A., Marrale M., Monteiro Gil O., Oestreicher U., Pajic J., Rakic B., Romm H., Trompier F., Veronese I., Voisin P., Vral A., Whitehouse C.A., Wieser A., Woda C., Wojcik A., Rothkamm K.** Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures //Radiat. Prot. Dosim. 2009. V. 147, N 4. P. 573-592.
14. **Tucker J.D., Luckinbill L.S.** Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by FISH whole-chromosome painting //Radiat. Res. 2011. V. 175, N 5. P. 631-637.
15. **Bhatti P., Yong L.C., Doody M.M., Preston D.L., Kampa D.M., Ramsey M.J., Ward E.M., Edwards A.A., Ron E., Tucker J.D., Sigurdson A.J.** Diagnostic X-ray examinations and increased chromosome translocations: evidence from three studies //Radiat. Environ. Biophys. 2011. V. 49, N 4. P. 685-692.
16. **Асеева Е.А., Снигирева Г.П., Неверова А.Л., Новицкая Н.Н., Хазинс Е.Д., Домрачева Е.В.** Клетки с множественными хромосомными нарушениями в группах лиц, подвергшихся облучению при различ-

- ных ситуациях, и их возможная биологическая роль //Радиац. биология. Радиозкология. 2009. Т. 49, № 5. С. 552-562.
17. **Hande M.P., Azizova T.V., Burak L.E., Khokhryakov V.F., Geard C.R., Brenner D.J.** Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study //Gene Chromosome Canc. 2005. V. 44, N 1. P. 1-9.
 18. **Wu H., Durante M., Furusawa Y.** Truly incomplete and complex exchanges in prematurely condensed chromosomes of human fibroblasts exposed in vitro to energetic heavy ions //Radiat. Res. 2003. V. 160, N 4. P. 418-424.
 19. **Durante M., Ando K., Furusawa Y., Obe G., George K., Cucinotta F.A.** Complex chromosomal rearrangements induced in vivo by heavy ions //Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 104, N 1-4. P. 240-244.

Identification of markers of occupational combined radiation exposure using a molecular cytogenetic mFISH technique

Sotnik N.V., Azizova T.V.

Southern Urals Biophysics Institute, FMBA, Ozersk

The present study was aimed to analyze damages of chromosome structures in Mayak PA workers occupationally exposed to combined radiation using an up-to-date molecular cytogenetic mFISH technique. The study of chromosome spreads showed that the stable chromosome aberration frequency in the group of workers exposed to external gamma-rays at cumulative absorbed red bone marrow (RBM) doses exceeding 0.2 Gy was significantly increased compared to the stable chromosome aberration frequency in the group of workers exposed at doses below 0.2 Gy due to the increased level of translocations which are a biological marker of external radiation exposure. The frequency of stable chromosome aberrations was significantly higher in the group of workers with ^{239}Pu body burden exceeding 1.48 kBq due to a considerable number of cells carrying complex chromosome rearrangements. We observed linear associations of translocation frequency with absorbed RBM dose from external gamma-rays and of complex chromosome rearrangement level with ^{239}Pu body burden. The frequency of chromosome aberrations (translocations and complex chromosome rearrangements) revealed by mFISH technique was shown to be an effective biological indicator for combined radiation exposure.

Key words: *chromosomal aberrations, Mayak PA workers, mixed exposure, ^{239}Pu , external gamma-rays, internal alpha-exposure, mFISH, translocation, complex chromosomal rearrangements, bioindication.*

References

1. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna, IAEA, 2011. 247 p.
2. **Anderson R.M., Marsden S.J., Wright E.G., Kadhim M.A., Goodhead D.T., Griffin C.S.** Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, vol. 76, no. 1, pp. 31-42.
3. **Anderson R.M., Marsden S.J., Paice S.J., Bristoe A.E., Kadhim M.A., Griffin C.S., Goodhead D.T.** Transmissible and non-transmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.*, 2003, vol. 159, no. 1, pp. 40-48.
4. **Moquet J.E., Fernandez J.L., Edwards A.A., Lloyd D.C.** Lymphocyte chromosomal aberrations and their complexity induced in vitro by plutonium-239 alpha-particles and detected by FISH. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 2001, vol. 47, no 3, pp. 549-556.

Sotnik N.V. – Head of Group; **Azizova T.V.*** – Deputy Director, Head of Dep., C. Sc., Med. SUBI.

*Contacts: 19 Ozersk road, Ozersk, Chelyabinsk region, Russia, 456780. Tel.: 8 (35130) 2-91-90; e-mail: clinic@subi.su.

5. **Barquinero F., Stephan G., Schmid E.** Effect of americium-241 α -particles on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004, vol. 80, no. 2. pp. 155-164.
6. **Okladnikova N.D., Osovets S.V., Kudryavtseva T.I.** ²³⁹Pu and chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2009, vol. 49, no 4, pp. 407-411. (In Russian).
7. **Tawn E.J., Whitehouse C.A.** Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with in vivo exposure to plutonium. *J. Radiol. Prot.*, 2005, vol. 25, no. 1. pp. 83-88.
8. **Curwen G.B., Tawn E.J., Cadwell K.K., Guyatt L., Thompson J., Hill M.A.** mFISH analysis of chromosome aberrations induced in vitro by α -particle radiation: examination of dose-response relationships. *Radiat. Res.*, 2012, vol. 178, no. 5, pp. 414-424.
9. **Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C.** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.*, 1996, vol. 12, no. 4, pp. 368-375.
10. **Chudoba I., Plesch A., Lorch T., Claussen U., Senger G.** High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet. Cell. genet.*, 1999, vol. 84, no. 3-4, pp. 156-160.
11. **Sotnik N.V., Osovets S.V., Scherthan H., Azizova T.V.** mFISH analysis of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to mixed radiation. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2014, vol. 53, no. 2, pp. 347-354.
12. **Sigurdson A., Ha M., Hauptmann M., Bhatti P., Sram R.J., Beskid O., Tawn E.J., Whitehouse C.A., Lindholm C., Nakano M., Kodama Y., Nakamura N., Vorobtsova I., Oestreicher U., Stephan G., Yong L.C., Bauchinger M., Schmid E., Chung H.W., Darroudi F., Roy L., Voisin P., Barquinero J.F., Livingston G., Blakey D., Hayata I., Zhang W., Wang C., Bennett L.M., Littlefield L.G., Edwards A.A., Kleinerman R.A., Tucker J.D.** International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat. Res.*, 2008, vol. 652, no. 2, pp. 112-121.
13. **Ainsbury E.A., Bakhanova E., Barquinero J.F., Brai M., Chumak V., Correcher V., Darroudi F., Fattibene P., Gruel G., Guclu I., Horn S., Jaworska A., Kulka U., Lindholm C., Lloyd D., Longo A., Marrale M., Monteiro Gil O., Oestreicher U., Pajic J., Rakic B., Romm H., Trompier F., Veronese I., Voisin P., Vral A., Whitehouse C.A., Wieser A., Woda C., Wojcik A., Rothkamm K.** Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat. Prot. Dosim.*, 2009, vol. 147, no. 4, pp. 573-592.
14. **Tucker J.D., Luckinbill L.S.** Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by FISH whole-chromosome painting. *Radiat. Res.*, 2011, vol. 175, no. 5, pp. 631-637.
15. **Bhatti P., Yong L.C., Doody M.M., Preston D.L., Kampa D.M., Ramsey M.J., Ward E.M., Edwards A.A., Ron E., Tucker J.D., Sigurdson A.J.** Diagnostic X-ray examinations and increased chromosome translocations: evidence from three studies. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2011, vol. 49, no. 4, pp. 685-692.
16. **Aseeva E.A., Snigireva G.P., Neverova A.L., Novitskaia N.N., Khazins E.D., Domracheva E.V.** The multiabberant cells in groups of people exposed to radiation due to different situations and their possible biological part. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2009, vol. 49, no. 5, pp. 552-562. (In Russian).
17. **Hande M.P., Azizova T.V., Burak L.E., Khokhryakov V.F., Geard C.R., Brenner D.J.** Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. *Gene Chromosome Canc.*, 2005, vol. 44, no. 1, pp. 1-9.
18. **Wu H., Durante M., Furusawa Y.** Truly incomplete and complex exchanges in prematurely condensed chromosomes of human fibroblasts exposed in vitro to energetic heavy ions. *Radiat. Res.*, 2003, vol. 160, no. 4, pp. 418-424.
19. **Durante M., Ando K., Furusawa Y., Obe G., Gearge K., Cucinotta F.A.** Complex chromosomal rearrangements induced in vivo by heavy ions. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, vol. 104, no. 1-4, pp. 240-244.