

Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование специфических хромосомных аномалий и вариантов у детей, проживающих в загрязненных по радиоактивному цезию (^{137}Cs) районах Российской Федерации после аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС)

С. Г. ВОРСАНОВА*/**, А. К. БЕРЕШЕВА*, Е. А. НИКОЛАЕВА*, А. Д. КОЛОТИЙ*,
И. А. ДЕМИДОВА*/**, И. Ю. ЮРОВ**, Л. С. БАЛЕВА*, Л. Г. СОХА*, Ю. Б. ЮРОВ **/*

*МНИИ педиатрии и детской хирургии МЗ Р, Москва, ул. Талдомская, 2

**Научный центр психического здоровья РАМН, 113152 Москва, Загородное ш., 2

АННОТАЦИЯ

Проведено цитогенетическое и в некоторых случаях молекулярно-цитогенетическое исследование 130 детей, проживающих в различных районах Брянской, Тульской и Калужской областей и обратившихся в генетическую консультацию по поводу задержки психомоторного развития, врожденных пороков и/или микроаномалий развития несиндромального генеза. Показано, что увеличение околоцентромерного гетерохроматина происходит за счет классической "сателлитной" ДНК. Обнаружен также полиморфизм сателлитной и рибосомальной ДНК в сторону увеличения на хромосоме 15 рh+. Высказывается предположение о положительной зависимости сроков проживания детей в загрязненных районах и экстремального увеличения С-гетерохроматина.

Проблемы оценки генетических последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) до настоящего времени продолжают оставаться весьма актуальными. Накоплен достаточно большой материал исследований по: научно обоснованному прогнозу генетической опасности повышенного фона радиации в загрязненных радионуклидами районах, выполненной в основном на мышах [1, 2]; расчету популяционных генетических доз; распространенности врожденных аномалий у детей в радиоактивно загрязненных регионах; сделаны прогнозы генетических эффектов [3]. Показаны также медицинские последствия аварии на ЧАЭС [4, 5]; обоснован цитогенетический мониторинг лиц, пострадавших от аварии, при исследовании неспецифических хромосом-

ных аномалий, т. е. аномалий, не связанных с фенотипическими проявлениями [6]. Остается не исследованной проблема последствий аварии на ЧАЭС, связанная с проявлением специфических хромосомных нарушений и аномалий, проявляющихся в виде численных и структурных aberrаций и коррелирующих с клиническими проявлениями (умственная отсталость, врожденные пороки и микроаномалии развития). Целью настоящего исследования являлось изучение уровня специфических хромосомных аномалий и увеличения околоцентромерного гетерохроматина отдельных хромосом у детей, обратившихся в генетическую консультацию по поводу умственной отсталости и врожденных пороков и/или микроаномалий развития в течение шести лет (1991–1997).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали клетки культуры лимфоцитов периферической крови детей, которые имели прямые показания для проведения цитогенетической диагностики. Цитогенетическое исследование проводили по общепринятым методам, включая культивирование клеток *in vitro*, приготовление хромосомных препаратов с применением дифференциального окрашивания (G- и C-методов) и анализа кариотипа под микроскопом при увеличении $\times 1250$ [7,8]. Хромосомным вариантом считали наличие в одной из хромосом 1, 9, 16 увеличения околоцентромерного гетерохроматина (С-блока) по сравнению с гомологом, оцениваемого в 5 баллов и выше. Оценку величины блока С-гетерохроматина проводили полуколичественным методом по "Системе учета размеров гетерохроматических участков хромосом 1, 9, 16, У и хромосом группы D и G" [9].

Молекулярно-цитогенетические исследования проводили по ранее описанным методам [10, 11], используя изотопную и флуоресцентную гибридизацию *in situ* и оригинальную коллекцию ДНК проб [12, 13]. Анализ результатов гибридизации *in situ* осуществляли по принятой нами технологии, применяя интер- и метафазные клетки [14]. Запись результатов цитогенетической и молекулярно-цитогенетической диагностики проводилась по международ-

ной номенклатуре стандартизации цитогенетических исследований ISCN, 1995 [15].

Обследовали три группы детей: I группа состояла из 44 пациентов, родившихся до аварии на ЧАЭС; II группа – 57 пациентов, родившихся после аварии (101 пациент из этих двух групп проживал в загрязненных по радиоактивному цезию районах Брянской, Тульской и Калужской областей) и III группа – 29 пациентов, проживающих в "чистых" районах этих же областей. Радиоактивное загрязнение территории цезием (^{137}Cs) составляло от 5,2 до 37,9 Ки/км² в "грязных" и от 0,05 до 1,41 Ки/км² в "чистых" районах (средний уровень загрязнения – 21,55 и 0,73 Ки/км² соответственно). Статистическую обработку проводили по общепринятому критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате цитогенетического обследования детей обнаружены как хромосомные аномалии, так и хромосомные варианты (табл. 1). Среди 44 пациентов I группы обнаружены два случая хромосомных аномалий (мозаичные формы синдрома Тернера с небольшим процентом аномального клона) (4,5 %) и семь случаев увеличения околоцентромерного гетерохроматина (С-гетерохроматина) хромосом 1,9,15 и Y: 1qh+ (2 пациента); 9qh+ (4 пациента); 15 cenh+ (3 пациента); Yqh+ (3 пациента) (27,3 %). Во II

Таблица 1

Результаты цитогенетического исследования детей с умственной отсталостью и врожденными пороками и аномалиями развития, проживающих на загрязненных и "чистых" территориях после аварии на ЧАЭС

	Дети, проживающие в загрязненных по ^{137}Cs районах (от 5,2 до 37,9 Ки/км ²)			Дети, проживающие в "чистых" районах (от 0,05 до 1,41 Ки/км ²)					
	I группа – родившиеся до аварии (44 пациента)			II группа – родившиеся после аварии (57 пациентов)			III группа (29 пациентов)		
	Норм. кариотип	Хром. аномалии	Варианты хромосом	Норм. кариотип	Хром. аномалии	Варианты хромосом	Норм. кариотип	Хром. аномалии	Варианты хромосом
Общее число пациентов	30	2	12*	44	7	6*	26	1	2*
Проценты	68,2	4,5	27,3	77,2	12,3	10,5	89,7	3,4	6,9
Средний возраст, лет	11,3			3,3			6,8		
Средняя продолжительность проживания в области	7,9			3,3			6,8		

* Отличия в трех группах достоверны ($p < 0,05$).

Хромосомные аномалии после проведения цитогенетической и молекулярно-цитогенетической диагностики в трех группах

Исследования	
цитогенетические	молекулярно-цитогенетические
I группа	
1. 45,X [20]/46,XX [80]	nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 1)[20]/ nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 2)[80]
2. 45,X[15]/46,XX[85]	nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 1)[15]/ nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 2)[85]
II группа	
3.47, XY,+21 [32]/46, XY [68]	47, XY,+ 21.ish 13p11.1,21p11.1(alpha R1-6 +)[12]/ 46, XY.ish 13p11.1,21p11.1(alpha R1-6 x 4)[18]
(1)	
4.47, XX, +21	
(2)	
5.47, XY, +21	
(3)	
6.45, X[150]/47,XXX[6]/46,XX[11]	nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 1)[150]/ nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 3)[6]/ nuc ish Xp11.1-q11.1(pYAM10-40 x 2)[11]
(4)	
7.46, XY, del (10)(pter → q2.6:)	46,XY,del (10)(q26).ish del(10)(q26.3q26.3)
(5)	(PAC45.12.K -)
8.46, XX, t (21; 21)	
(6)	
9. 46, XY, inv(2)(p21q12)	
(7)	
III группа	
10. 46, XX,del(18)(pter → q22.2:)	46, XX,del(18)(q22.2).ish del (18)(q23q23)
(1)	(PAC23.5.M -)

группе среди 57 детей обнаружено семь случаев хромосомных аномалий (полные, мозаичная и транслокационная формы синдрома Дауна; мозаичная форма гоносомных анеуплоидий; теломерная делеция хромосомы 10, парацентрическая инверсия хромосомы 2) (12,3 %) и семь случаев увеличения С-гетерохроматина (хромосомные варианты) – 9qh+ (1 пациента), 15cenh+ (3 пациента), Yqh+ (2 пациента) (10,5 %). Среди 29 пациентов III группы обнаружена одна хромосомная аномалия (делеция длинного плеча хромосомы 18) (3,7 %) и два хромосомных варианта (9qh+ и Yqh+) (7,4 %). Полученные результаты исследований представлены в таблицах 1–3 и на рис. 1.

Следует отметить, что в случаях мозаичных форм гоносомных анеуплоидий, когда аномальные клоны присутствовали в 20 % и менее клеток (табл. 2, случаи 1, 2, 6), а также при теломерных и субтеломерных делециях хромосом 10 и 18 (табл. 2, случаи 7, 10) применяли методы молекулярно-цитогенетической диагностики (флюоресцентная гибридизация *in situ* – FISH), используя центромерную ДНК пробу для хромосомы X (pYAM 10–40) и сайт-специфичные пробы для хромосомы 10 и

18 (PAC 45.12.K и PAC 23.5.M). В каждом случае мозаицизма после проведения FISH анализировали не менее 100 интер- и 30 метафазных клеток. В 1-м и 2-м случаях (см. табл. 2) у детей с классической клинической картиной синдрома Тернера после проведения традиционного цитогенетического исследования обнаружен нормальный кариотип (46,X), а в 6-м случае при атипичном фенотипе синдрома Тернера определен только аномальный клон –45,X. Как показано ранее, подобное несоответствие карио- и фенотипа является причиной

Таблица 3

Хромосомные варианты у детей в трех группах после проведения цитогенетических исследований

I группа	
1.	1 qh+ – 2 пациента
2.	9qh+ – 4 пациента
3.	15cenh+ – 3 пациента
4.	Yqh+ – 3 пациента
II группа	
1.	9qh+ – 1 пациент
2.	15cenh+ – 3 пациента
3.	Yqh+ – 2 пациента
III группа	
1.	9qh+ – 1 пациент
2.	Yqh+ – 1 пациент

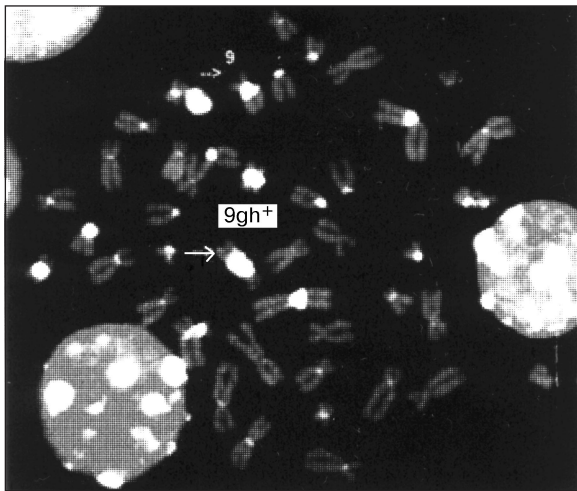


Рис. 1. Увеличение гетерохроматинового района хромосомы 9 (вариант 9qh+), выявляемое с помощью гибридизации in situ. Стрелками отмечены две гомологичные хромосомы 9.

для проведения FISH-исследования [16]. FISH-анализ показал наличие аномального клона клеток (кариотип – 45,X) в 1-м и 2-м случаях (20 и 15 % клеток соответственно), а в 6-м случае – дополнительно два клона – 47,XXX в 3,6 % и 46,XX в 6,6 % (см. табл. 2). Кроме того, после проведения FISH-диагностики мозаичный случай синдрома Дауна был подтвержден, однако аномальный клон был обнаружен в большем числе клеток (40 %) (см. табл. 2). При дистальных делециях хромосом 10 и 18 уточнены точки разрыва на аномальных хромосомах, указанные также в табл. 2.

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно сказать, что хромосомные варианты чаще встречаются в I группе детей, рожденных до аварии на ЧАЭС, по сравнению со II и III группами ($p < 0,05$ при сравнении I со II группой, а также I с III и II с III группами). Результаты показывают прямую зависимость данной ситуации от длительности проживания детей в радионуклидно загрязненных районах. Так, средняя продолжительность проживания детей в радиоактивно загрязненных районах в I группе составляет 7,9 лет (при среднем возрасте 11,3 лет), тогда как во II группе – 3,3 года (при среднем возрасте таком же). Полученные результаты заставляют думать о том, что гетерохроматиновые околоцентромерные районы хромосом 1, 9, 15 и Y имеют тенденцию к изменению в сторону увеличения

у пациентов, проживающих в загрязненных по радионуклидам районах, и их число связано с временем проживания в этих районах. Ранее был известен полиморфизм C-гетерохроматина в исследованиях отдельных групп индивидуумов [17]. Показано как увеличение, так и уменьшение C-гетерохроматина у детей с умственной отсталостью и врожденными пороками и/или микроаномалиями развития [18, 19], а также его увеличение у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции [20]. Кроме того, известны исследования, где показано увеличение околоцентромерных гетерохроматиновых районов тех же хромосом у индивидуумов, проживающих в условиях высокогорья [21]. Последний феномен представлен как ответ на постоянное влияние гипоксии в соответствующих условиях проживания. Другими словами, этот феномен можно объяснить гипотезой о возможной селективной ценности C-гетерохроматина в адаптации к некоторым экстремальным условиям жизни. В наших случаях пока трудно предположить какое-либо влияние радиации на C-гетерохроматин, но не вызывает сомнения факт, что различия по числу детей с экстремальным хромосомным вариантом между различными группами достоверны, и это необходимо учитывать в дальнейших исследованиях. Кроме того, C-гетерохроматин исследован молекулярно с помощью ISH анализа (ISH- и FISH-методов). В качестве объекта исследования использовался C-гетерохроматин хромосомы 15, как наиболее часто встречающийся в наших исследованиях вариант. При этом использовались альфоидные и "классические" сателлитные ДНК пробы (MCG15-01 и MCG-C-15 соответственно). При количественном анализе (подсчет зерен серебра на околоцентромерном гетерохроматине хромосомы 15) обнаружено, что увеличение C-гетерохроматина происходит за счет увеличения числа копий "классической" сателлитной ДНК (рис. 2). При использовании бета-сателлитной и рибосомальной проб (MCG-B-01 и MCG-Ribo-01 соответственно) показан также полиморфизм этих участков в сторону увеличения на хромосоме 15 cenh+. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что обнаруженная вариация

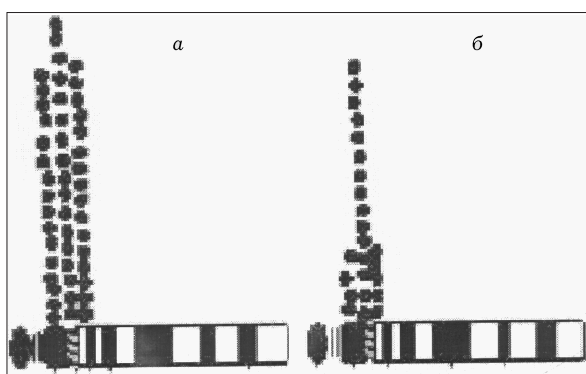


Рис. 2. Пример анализа хромосомных вариантов в хромосоме 15 при использовании гибридизации *in situ* с ДНК пробой для классической сателлитной ДНК. Гетерохроматиновые участки хромосом резко различаются по количеству зерен серебра ("а" – вариант хромосомы 15 *cenh+* с резко увеличенным содержанием сателлитной ДНК по сравнению с гомологичной хромосомой "б").

бельность отражает цитологический полиморфизм С-гетерохроматина, т. е. большее число копий соответствует большим по размерам С-сегментам.

Обсуждая специфические хромосомные aberrации, связанные с фенотипом индивидуумов, следует сказать, что увеличение их числа во II (12,3 %) по сравнению с I (4,5 %) и III (3,7 %) группами не носит убедительного характера ($p > 0,5$), и эти результаты нуждаются в дальнейшем накоплении. Однако следует отметить, что в I группе встречаются только мозаичные формы. Как известно, к мозаичным формам специфических хромосомных аномалий или синдромов приводит неправильное деление клеток на различных стадиях внутриутробного развития плода. Как правило, при мозаичных формах определенного синдрома наблюдаются отсутствие многих клинических признаков и более легкое течение заболевания, так называемая "forme fruste", и в подобных случаях кариотип пробанда можно уточнить исключительно с помощью молекулярно-цитогенетических методов диагностики. Во II группе детей, рожденных после аварии на ЧАЭС, встречаются как мозаичные, так и полные формы хромосомных аномалий, в том числе и синдром Дауна (трисомия хромосомы 21). Причем случаи регулярной трисомии 21 наблюдались в районе при загрязнении в 34,72 Ки/км². В настоящее время трудно интерпретировать различный удельный вес специфических хромосомных

aberrаций во всех трех группах за шесть лет исследований, с одной стороны, а с другой – приведенные результаты отражают ситуацию данных регионов в отношении хромосомных синдромов после аварии на ЧАЭС и показывают возможности молекулярно-цитогенетической диагностики при обследовании детей с умственной отсталостью, ВПР и/или МАР, подвергшихся различным влияниям радионуклидов.

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть высокую чувствительность хромосом человека к действию различных мутагенных факторов, в том числе и к радиации [22]. При анализе их воздействия следует различать нарушения в соматических и половых клетках. Первые затрагивают жизнедеятельность настоящего организма, тогда как вторые проявляются только в следующих поколениях. Мутации хромосом в зародышевых клетках ведут к образованию неполных гамет, в результате которых возможна гибель зигот, эмбрионов на ранних стадиях внутриутробного развития, а также рождение детей с хромосомными синдромами или аномалиями, т. е. истинными или специфическими хромосомными aberrациями, которые проявляются в виде определенной клинической картины или, как принято называть, определенного фенотипа. В данной работе мы представляем результаты исследований специфических хромосомных мутаций у детей, обратившихся за генетической консультацией в течение шести лет. Мутации же хромосом в соматических клетках ведут к образованию неспецифических хромосомных aberrаций в виде хромосомных или хроматидных пробелов, разрывов, обменов, не ведущих к определенному фенотипу, характерному для отдельного хромосомного синдрома. Как известно, подобные мутации не наследуются, но при изучении такого рода воздействия представляется возможным оценить качественно и количественно действие радиации, однако его нельзя перенести на половые клетки, результатом действия на которые являются хромосомные синдромы у детей. Как те, так и другие хромосомные мутации следует изучать и учитывать в исследованиях по воздействию различных мутагенов, так как научно-технический прогресс, с одной стороны, и неблагоприятные экологические обстоятельства – с другой, сопровождаются непрерывным увеличением содержания мутагенных

факторов в окружающей среде, а хромосомные соматические мутации, проявляющиеся в первом поколении, в дальнейшем могут вызывать грубые нарушения генного баланса в половых клетках, что представляет серьезную опасность для наследственности будущих поколений.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Гайченко, Г. О. Дешко, Междунар. конф. "Биологические и радиоэкологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской атомной станции" (11–18 сентября 1990 г., Зеленый Мыс), М., 147.
2. М. Д. Померанцева, Л. К. Рамайя, А. В. Чехович, *Генетика*, 1996, **32**: 2, 298–303.
3. Н. П. Бочков, А. В. Аклев, Л. С. Балева, *Вестн. РАМН*, 1996, 6, 64–72.
4. А. Д. Царегородцев, *Медицинская радиология и радиационная безопасность*, 1996, 2, 3–7.
5. А. Ф. Цыб, Там же, 1998, 1, 18–23.
6. М. А. Пилинская, А. М. Шеметун, С. С. Дыбский и др., *Цитология и генетика*, 1994, **28**: 3, 18–25.
7. D. A. Hungerford, *Staintech.*, 1965, 40, 333–338.
8. M. Seabright, *Lancet*, 1972, II, 971–972.
9. А. А. Прокофьева-Бельговская, Полиморфизм хромосом у человека, М., 1981, 245–246.
10. Ю. Б. Юров, *Бюл. exper. биол. мед.*, 1984, 5, 595–598.
11. I. V. Soloviev, Yu. B. Yurov, S. G. Vorsanova, P. Malet, *Focus*, 1994, **16**: 4, 115–116.
12. I. V. Soloviev, Yu. B. Yurov, I. Ioannou et al., *Cs. Pediat.*, 1997, **52**: 7, 529–538.
13. Yu. B. Yurov, I. V. Soloviev, S. G. Vorsanova et al., *Ibid.*, 1997, **52**: 7, 550–554.
14. С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров, Г. В. Дерягин и др., *Бюл. exper. биол. мед.*, 1991, 10, 413–415.
15. ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) – *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1995, 114.
16. S. G. Vorsanova, Yu. B. Yurov, I. V. Soloviev, et al., *Cs. Pediat.*, 1997, **52**: 7, 538–544.
17. L. Y. Hsu, P. A. Benn, H. L. Tannenbaum et al., *Amer. J. Med. Genet.*, 1987, 26, 95–101.
18. И. А. Демидова, С. Г. Ворсанова, *Медицинская генетика* (экспресс-информация), 1990, 12, 1–9.
19. О. А. Подугольникова, Х. М. Сушанло, М. Г. Блюмина, А. А. Прокофьева-Бельговская, *Генетика*, 1984, **20**: 1, 177–182.
20. С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров, И. В. Соловьев и др., *Российский вестн. перинатологии и педиатрии*, 1998, **43**: 1, 31–36.
21. R. Rossino, S. Orru, A. Milia, M. Mameli, *Atti/ Assoc. Genet. Ital.*, 1988, 34, 275–276.
22. Н. П. Бочков, А. Н. Чеботарев, Наследственность человека и мутагены внешней среды, М., Медицина, 1989.

Cytogenetic and Molecular-Cytogenetic Study of Specific Chromosome Abnormalities and Variants in Children Living in Radioactive Cesium (^{137}Cs) – Polluted Regions of the Russian Federation after the Chernobyl Atomic Electric Power Station

S. G. VORSANOVA, A. K. BERESHEVA, E. A. NIKOLAEVA, A. D. KOLOTII,
I. A. DEMIDOVA, I. YU. YUROV, L. S. BALEVA, L. G. SOKHA, YU. B. YUROV

A cytogenetic and in some cases molecular-cytogenetic study of 130 children living in various districts of Bryansk, Tula and Kaluga oblasts who applied for genetic counselling because of psychomotor retardation, congenital malformations or/and non-syndromic microabnormalities of development was carried out. It is demonstrated that a pericentromeric heterochromatin augmentation took place due to classic "satellite" DNA. A polymorphism of the satellite and ribosomal DNA with a tendency to increase on Chromosome 15 ph+ was also found. It is hypothesized that the extreme heterochromatin C increase depends on the time of the children's living in polluted regions.