

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУУМОВ ПО СПОНТАННОЙ ЧАСТОТЕ ЛИМФОЦИТОВ С МИКРОЯДРАМИ. ОСОБЕННОСТИ И СЛЕДСТВИЯ

**© А. М. Серебряный,^{1,*} А. В. Аклеев,² А. В. Алещенко,¹ М. М. Антошина,³ О. В. Кудряшова,⁴
Н. И. Рябченко,³ Л. П. Семенова,¹ И. И. Пелевина⁴**

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва,

² Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск,

³ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск,

⁴ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва;

* электронный адрес: amserebr@sky.chph.ras.ru

С помощью микроядерного теста в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В измерена спонтанная частота лимфоцитов периферической крови с микроядрами (МЯ) у 76 жителей г. Москвы, 35 жителей г. Обнинска и 122 жителей Челябинской обл. В отличие от распределения индивидуумов по спонтанной частоте клеток с аберрациями хромосом, являющегося пуссоновским (Кузнецова и др., 1980), распределение индивидуумов по спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ во всех трех массивах можно признать (χ^2 -тест) лог-нормальным. Распределение индивидуумов в объединенном массиве жителей г. Москвы и г. Обнинска, а также в едином массиве всех обследованных следует признать лог-нормальным ($P = 0.70$ и 0.86 соответственно) и нельзя признать пуссоновским, биномиальным или нормальным. Учитывая, что лог-нормальный характер распределения по спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ наблюдали ранее при обследовании 473 детей г. Москвы, сделан вывод о том, что лог-нормальное распределение индивидуумов по спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ является закономерностью, присущей этому показателю поврежденности генома лимфоцитов. Напротив, распределение индивидуумов по индуцированной облучением *in vitro* частоте лимфоцитов с МЯ принципиально отличается от спонтанного, и в большинстве случаев его можно признать нормальным. Лог-нормальный характер распределения указывает на то, что появление у индивидуума спонтанного повреждения (нестабильности генома) в каком-либо одном лимфоците увеличивает вероятность появления повреждения и в других лимфоцитах. Авторы предполагают, что поврежденные предшественники лимфоцитов — стволовые клетки — обмениваются информацией с неповрежденными, т. е. протекает процесс по типу «эффекта свидетеля»; можно предполагать также передачу повреждения дочерним клеткам при делении стволовых клеток.

Ключевые слова: лимфоциты, микроядерный тест, спонтанная частота мутаций, распределения по частоте клеток с микроядрами.

Природа спонтанных мутаций — мутаций, выявляемых у не подвергавшихся экспериментальным внешним воздействиям организмов, всегда занимала умы исследователей. Указывались разнообразные возможные причины их появления: случайные ошибки при редупликации генома, действие эндогенных или экзогенных химических факторов, природного радиационного фона, космических излучений.

На протяжении ряда лет нами изучалось влияние радиоактивного загрязнения местности, возникшего в результате аварий на Чернобыльской АЭС (Pelevina et al., 1999) и Южном Урале (Akleeve et al., 2004), на способность лимфоцитов периферической крови жителей этих местностей к адаптивному ответу. Использовался рекомендованный для этих целей микроядерный тест в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В (Albertini et al., 2000; Fenech et al., 2003). Параллельно были исследованы также и лимфоциты крови 233 контрольных индивидуумов, проживающих в «чистом» Обнинске, «чистых» районах Челябинской обл. и мегаполисе Москве.

Целью настоящей работы был анализ характера распределений индивидуумов по спонтанной частоте стимулированных лимфоцитов периферической крови с микроядрами (МЯ) в каждом из этих регионов, а также в обобщенном массиве всех обследованных. Полученные результаты позволили сделать некоторые принципиальные предположения о процессах возникновения первичных повреждений генома, реализующихся затем в виде МЯ.

Материал и методика

В работе использовали результаты определения спонтанной частоты стимулированных лимфоцитов периферической крови с МЯ у 76 жителей г. Москвы, 35 жителей г. Обнинска, а также 122 жителей Челябинской обл.

Микроядерный тест проводили по методике (Albertini et al., 2000; Fenech et al., 2003). Все использованные реактивы получены от фирмы «Панэко» (Москва). Оценивали

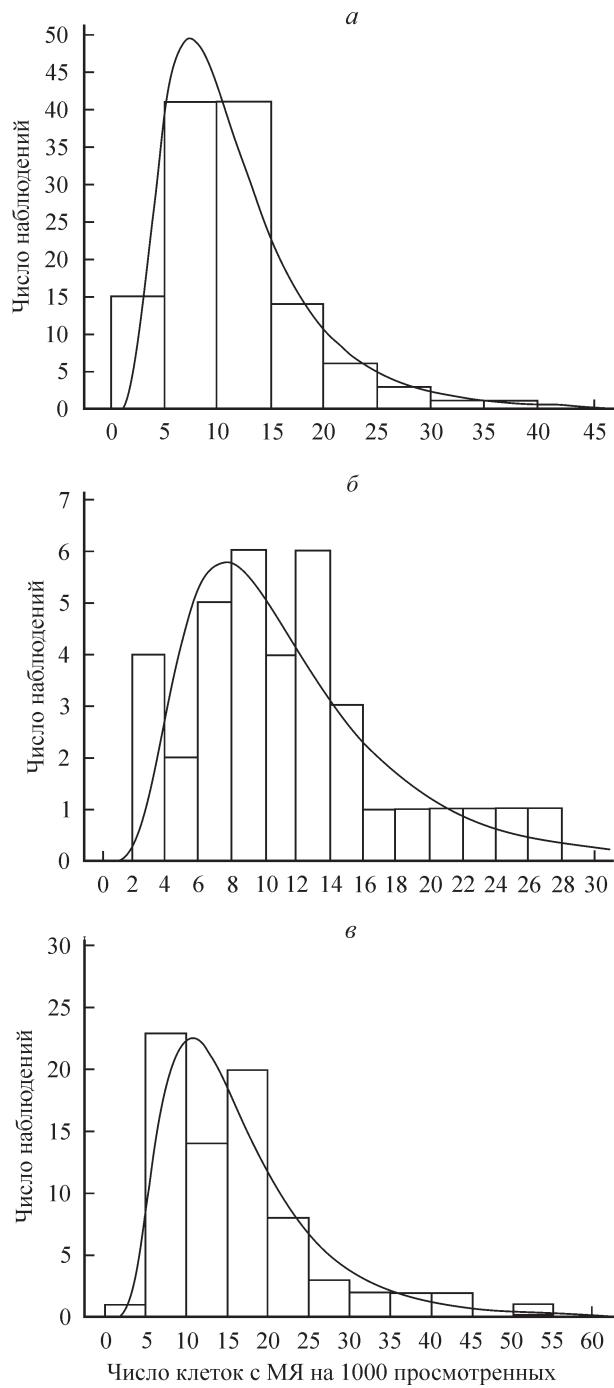


Рис. 1. Лог-нормальное распределение индивидуумов в обследованных массивах по частоте лимфоцитов с микроядерами.
а — жители Челябинской обл.; б — жители г. Обнинска, в — жители г. Москвы. Непрерывная линия на рис. 1—3 — граница соответствующего теоретического распределения.

долю двуядерных клеток с МЯ среди 1000 двуядерных клеток, цитокинез которых остановлен цитохалазином В, т. е. в клетках, проходивших первый митоз между 48 и 72 ч после стимуляции фитогемагглютинином (ФГА).

К 0.7 мл гепаринизированной (15 ед./мл) крови добавляли 3.3 мл среды RPMI с 20 % сыворотки крупного рогатого скота, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл пенициллина, 7 мкг/мл ФГА и инкубировали в термостате при 37 °C. Через 48 ч после начала стимуляции вводили цитохалазин В до концентрации 6 мкг/мл и продолжали куль-

тивирование еще 24 ч. Затем клетки обрабатывали гипотоническим раствором 0.125 M KCl, фиксировали в смеси метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1) и наносили на предметные стекла. Высохшие мазки окрашивали азур-эозином. Каждый препарат просчитывали два независимых счетчика. В подавляющем числе случаев поврежденная клетка содержала одно МЯ, иногда встречались клетки с двумя или тремя МЯ. Статистические расчеты и анализ типа распределений проводили, используя пакет программ Statistica.

Результаты и обсуждение

Среднее арифметическое значение спонтанной частоты поврежденных лимфоцитов периферической крови, измеренное с помощью микроядерного теста в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В, у жителей г. Москвы оказалось равным (среднее ± стандартная ошибка) 16.58 ± 1.09 на 1000 просмотренных двуядерных клеток. Соответствующие значения для жителей г. Обнинска оказались равными 11.74 ± 1.02 , а для жителей Челябинской обл. — 11.77 ± 0.56 .

Для понимания процессов, приводящих к появлению лимфоцитов с МЯ, оказался интересен характер варьирования спонтанной частоты лимфоцитов с МЯ между обследованными индивидуумами. Оказалось, что распределение жителей Челябинской обл. по частоте лимфоцитов с МЯ можно считать лог-нормальным (χ^2 -тест, $P = 0.224$) (рис. 1, а; см. таблицу) и нельзя считать ни пуассоновским, ни биномиальным, ни нормальным. Распределение обследованных жителей г. Обнинска также можно считать лог-нормальным ($P = 0.624$) (рис. 1, б; см. таблицу), хотя можно признать также и нормальным с относительно низким уровнем значимости, равным 0.13 (см. таблицу). Массив жителей Москвы оказался менее однородным. Но и его можно признать лог-нормальным и нельзя — нормальным (рис. 1, в; см. таблицу). Однако при объединении и укрупнении массивов влияние случайных факторов становится менее заметным и характер варьирования частоты лимфоцитов с МЯ между индивидуумами становится более закономерным. Так, уже в объединенном массиве жителей г. Москвы и г. Обнинска распределение индивидуумов можно признать лог-нормальным с очень высоким уровнем значимости, равным 0.70 (рис. 2, а; см. таблицу), а распределение индивидуумов в едином массиве всех обследованных в этой работе следует признать лог-нормальным с еще большим уровнем значимости — 0.86 (рис. 2, б; см. таблицу).

Лог-нормальный характер распределения по спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ наблюдался нами и раньше, при обследовании 473 детей из различных детских садов г. Москвы (Пелевина и др., 2001).

Из этих фактов можно сделать вывод о том, что лог-нормальное распределение индивидуумов по спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ не является случайной характеристикой отдельной конкретной выборки, а является закономерностью, присущей этому показателю спонтанной поврежденности генома лимфоцитов. Правда, иногда при небольших объемах массива распределение в нем можно принять и за нормальное, но всегда, и с большей надежностью, его можно считать лог-нормальным.

Существенно, что распределение индивидуумов по индуцированной частоте лимфоцитов с МЯ принципиально отличается от спонтанного распределения, так как в

Результаты проверок характера распределений с помощью χ^2 -теста

Тип распределения	P
Массив жителей г. Москвы	
Лог-нормальное	0.101
Нормальное	0.00001
Массив жителей г. Обнинска	
Лог-нормальное	0.624
Нормальное	0.130
Массив жителей Челябинской обл. 122 человека	
Нормальное	0.0102
Лог-нормальное	0.224
Пуассоновское	0.00051
Биномиальное	<0.00000
Московско-Обнинский массив. 111 человек	
Нормальное	<0.00000
Лог-нормальное	0.705
Пуассоновское	<0.00000
Биномиальное	<0.00000
Все обследованные	
Лог-нормальное	0.860
Распределение жителей Челябинской обл. по частоте клеток с МЯ после облучения лим- фоцитов <i>in vitro</i> в дозе 1.0 Гр. Соответствие нормальному распределению	0.4056
То же для Обнинской части Московско-Об- нинского массива	0.1062

Примечание. При уровне значимости $P < 0.05$ нулевая гипотеза о соответствии экспериментальных распределений теоретическим отвергается.

большинстве случаев его можно признать нормальным. Так, мы отмечали, что распределение 473 детей по частоте лимфоцитов с МЯ, индуцированных облучением *in vitro* в дозе 1.0 Гр, не является лог-нормальным и близко к нормальному (Пелевина и др., 2001). На рис. 3, б приведено распределение 35 доноров из г. Обнинска, входящих в общую группу обследованных, распределение которых по спонтанной частоте представлено на рис. 2, б. Видно, что в отличие от распределения по спонтанной частоте распределение по индуцированной облучением *in vitro* частоте лимфоцитов с МЯ можно признать нормальным (см. таблицу). Это же относится и к массиву жителей Челябинской обл. (рис. 3, а; см. таблицу).

Если бы появление лимфоцитов с МЯ у индивидуума являлось следствием аддитивного действия независимых случайных факторов (как повреждающих геном, так и случайных ошибок репликации), то распределение людей по спонтанной частоте клеток с МЯ должно было бы быть пуассоновским или нормальным (Айвазян и др., 1983а; Limpert et al., 2001). Именно пуассоновское распределение по спонтанной частоте лимфоцитов с аберрациями хромосом наблюдается у 680 обследованных индивидуумов (Кузнецов и др., 1980). Однако распределение по

спонтанной частоте лимфоцитов с МЯ является лог-нормальным. Из этого различия вытекает, что, возможно, микроядерный тест и метафазный анализ частоты лимфоцитов с аберрациями хромосом отражают разные процессы, протекающие *in vivo* и ведущие к появлению спонтанно поврежденных клеток.

Принципиальным отличием лог-нормального распределения от нормального или пуассоновского распределения является зависимость приращения переменной от накопленного ее значения. «Случайный прирост, вызываемый действием каждого следующего фактора, пропорционален уже достигнутому к этому моменту значению исследуемой величины (мультипликативный характер воздействия фактора)» (Айвазян и др., 1983б). В нашем случае это означает, что увеличение частоты лимфоцитов с МЯ у индивидуума пропорционально уже имеющейся у него частоте поврежденных клеток, т. е. чем больше у него лимфоцитов с МЯ, тем больше вероятность того, что эта частота еще более возрастет. Другими словами, характер распределения указывает на то, что появление у индивидуума по какой-либо причине повреждений (нестабильности генома) в каком-либо одном лимфоците увеличивает вероятность появления повреждения в других лимфоцитах.

Какие причины могут обусловливать такой механизм возникновения лимфоцитов с МЯ, каков характер подобного влияния одного лимфоцита на другой на данном

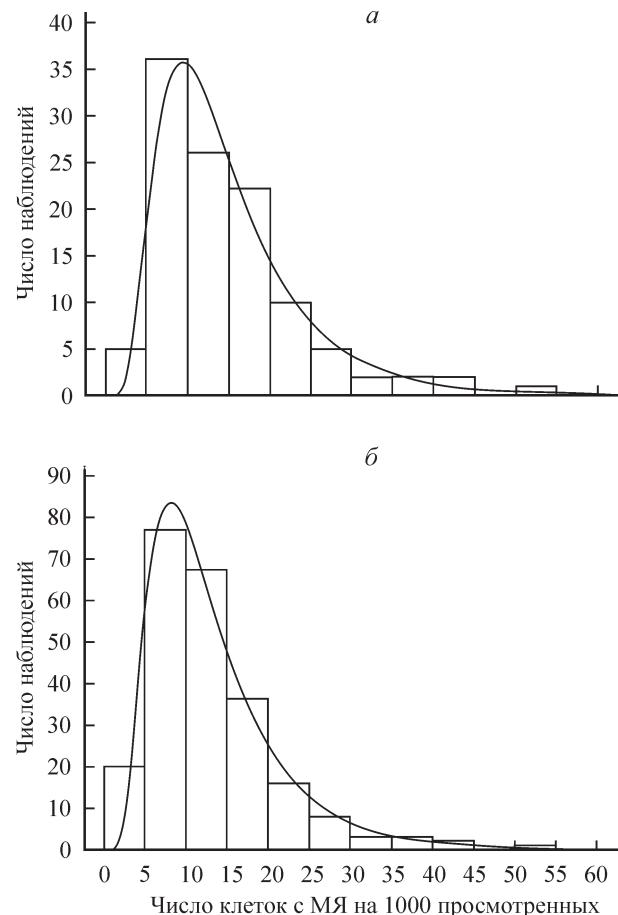


Рис. 2. Лог-нормальное распределение индивидуумов по частоте лимфоцитов с микроядрами.

α — в объединенном массиве жителей г. Москвы и г. Обнинска; β — в объединенном массиве всех обследованных индивидуумов.

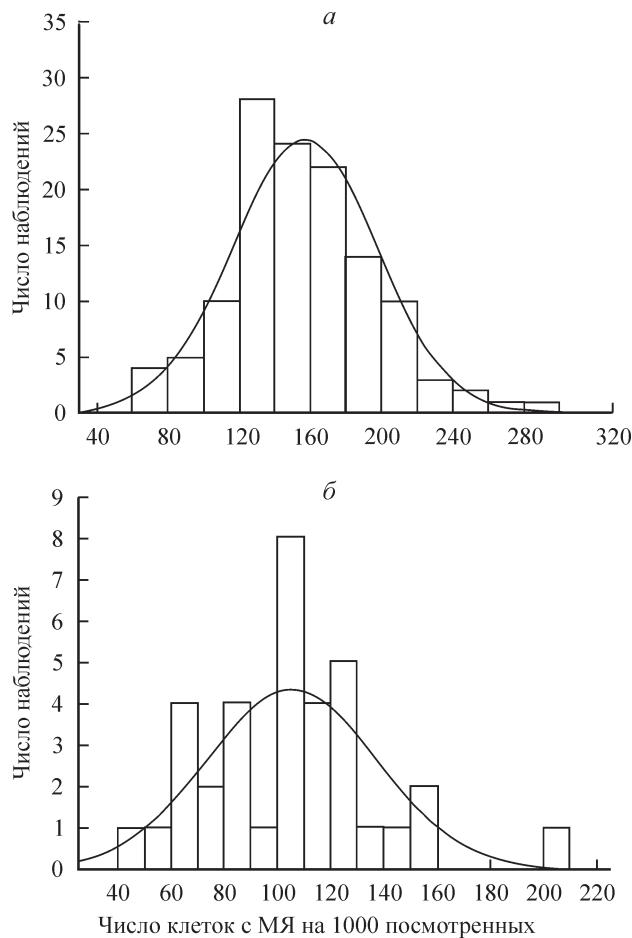


Рис. 3. Распределение индивидуумов по индуцированной частоте лимфоцитов с микроядрами после облучения клеток *in vitro* в дозе 1.0 Гр.

a — для жителей Челябинской обл.; *б* — для жителей г. Обнинска.

этапе работы указать невозможно, но гипотетически можно связать его с особенностью созревания лимфоцитов. Лимфоциты периферической крови образуются из стволовых клеток в костном мозге. После ряда трансформаций *in vivo* они превращаются в функционально зрелые клетки, после чего поступают в кровь, где циркулируют лишь определенный, относительно небольшой срок и затем заменяются новыми клетками. В норме созревшие лимфоциты не делятся, в экспериментах их стимулируют к делению митогеном и фиксируют. До деления в клетке МЯ нет, и возникает оно на базе нестабильности генома, в результате повреждения генома до стимуляции к делению.

Нам представляется вероятным следующий механизм формирования лог-нормального распределения. Возможность влияния поврежденного лимфоцита на неповрежденный в циркулирующих лимфоцитах маловероятна, но лимфоциты непрерывно возникают из стволовых клеток, и нельзя исключить, что поврежденная стволовая клетка обменивается информацией с неповрежденными — про текает процесс по типу «эффекта свидетеля», хорошо уже описанному разными авторами (Matsumoto et al., 2007). Можно предполагать также передачу повреждения дочерним клеткам при делении стволовых клеток.

В любом случае выявляемая у индивидуума частота лимфоцитов с МЯ не является следствием одномоментно-

го события (например, случайного повреждения ДНК конкретного лимфоцита), а есть следствие двух и, возможно, большего числа событий, итогом постепенного накопления изменений, выявляемых в конце концов в виде клетки с МЯ. Возможно также, что наблюдаемая частота клеток с МЯ у конкретного индивидуума определяется взаимодействием двух факторов: внутреннего (дефектами геномной структуры, предрасположенностью) и внешнего, например повреждающего воздействия факторов окружающей среды. Но ясно, что выявленная у индивидуума повышенная спонтанная частота лимфоцитов с МЯ может быть объяснена не только повышенным воздействием повреждающих факторов внешней среды, но и повышенной вероятностью возникновения у него клеток с МЯ вследствие индивидуальных особенностей. Описанный в работе характер распределения индивидуумов по спонтанной частоте клеток с МЯ следует учитывать при использовании МЯ-теста при оценке повреждающих факторов окружающей среды.

Известно, что среднее значение лог-нормального распределения можно оценить как среднее геометрическое выборочных значений, в силу чего оно всегда меньше среднего арифметического того же ряда (Limpert et al., 2001). Так, среднее арифметическое значение для Московско-Обнинского массива, изображенного на рис. 2, *а*, равно 15.05 ± 0.84 двуядерных клеток с МЯ на 1000 всех двуядерных клеток. Среднее значение лог-нормального распределения, которому оно соответствует, равно 2.5571 с вариансой, равной 0.3191. После взятия антилогарифма и расчета стандартной ошибки получаем значение среднего 12.90 ± 1.05 двуядерных клеток с МЯ на 1000 всех двуядерных клеток. Поэтому в сравнительных исследованиях с помощью микроядерного теста следует с осторожностью пользоваться средним арифметическим и *t*-критерием, используя эти параметры лишь в случае небольших выборок, распределение в которых иногда можно признать и нормальным, и лог-нормальным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00347а).

Список литературы

- Айазян С. А., Енюков И. С., Мешалкин Л. Д. 1983а. Основы моделирования и первичная обработка данных. М.: Финансы и статистика. С. 169.
- Айазян С. А., Енюков И. С., Мешалкин Л. Д. 1983б. Основы моделирования и первичная обработка данных. М.: Финансы и статистика. С. 174.
- Кузнецов А. И., Кружалов А. И., Илющенко В. Г., Зыкова И. А., Кудрицкий Ю. К. 1980. Возрастно-половая зависимость спонтанной частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови человека. Сообщение 1. Возрастная динамика спонтанной частоты хромосомных aberrаций и aberrантных клеток в лимфоцитах периферической крови. Генетика. 16 (7) : 1285—1293.
- Пелевина И. И., Алещенко А. В., Антошина М. М., Кудряшова О. В., Курнешова Л. Е., Готлиб В. Я., Носкин Л. А., Семенова Л. П., Серебряный А. М. 2001. Уровень спонтанных и индуцированных облучением цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови детей в зависимости от возраста и условий жизни. Радиационная биология. Радиоэкология. 41 (5) : 573—579.
- Aklev A. V., Aleschenko A. V., Gotlib V. Ja., Kudriashova O. V., Semenova L. P., Serebryanyi A. M., Khydyakova O. I., Pellevina I. I. 2004. Adaptive capacities of lymphocytes in *Techi* ги-

verside residents, chronically exposed to radiation. Jap. J. Health Phys. 39 : 375—381.

Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E. G., Tice R., Waters M. D., Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutat. Res. 463 : 111—172.

Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat. Res. 534 : 65—75.

Limpert E., Stahel W. A., Abbt M. 2001. Log-normal distributions across the sciences: keys and clues. bioScience. 51 : 341—352.

Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A., Kobayashi Y., Ohnishi T. 2007. Vanguards of paradigm shift in radiation-induced adaptive and bystander responses. J. Radiat. Res. 48 : 97—106.

Pelevina I. I., Afanasev G. G., Gotlib V. Ya., Serebryanyi A. M. 1999. The disturbances of the adaptive response ability after low dose irradiation as a result of Chernobyl accident. In: Consequences of the Chernobyl catastrophe on human health. New York: Nova Sci. Publ. 177—188.

Поступила 4 V 2010

DISTRIBUTION OF INDIVIDUALS BY SPONTANEOUS FREQUENCIES OF LYMPHOCYTES WITH MICRONUCLEI. PARTICULARITY AND CONSEQUENCES

*A. M. Serebryanyi,¹ * A. V. Akleyev,² A. V. Aleshchenko,¹ M. M. Antoschina,³ O. V. Kudryashova,⁴
N. I. Ryabchenko,³ [L. P. Semenova],¹ I. I. Pelevina¹*

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow,

² Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk,

³ Medical Radiological Research Center RAMN, Obninsk,

and ⁴ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow;

* e-mail: amsereb@sky.chph.ras.ru

By micronucleus (MN) assay with cytokinetic cytochalasin B block, the mean frequency of blood lymphocytes with MN has been determined in 76 Moscow inhabitants, 35 people from Obninsk and 122 from Chelyabinsk region. In contrast to the distribution of individuals on spontaneous frequency of cells with aberrations, which was shown to be binomial (Kusnetzov et al., 1980), the distribution of individuals on the spontaneous frequency of cells with MN in all three massif can be acknowledged as log-normal (χ^2 test). Distribution of individuals in the joined massifs (Moscow and Obninsk inhabitants) and in the unique massif of all inspected with great reliability must be acknowledged as log-normal (0.70 and 0.86 correspondingly), but it cannot be regarded as Poisson, binomial or normal. Taking into account that log-normal distribution of children by spontaneous frequency of lymphocytes with MN has been observed by the inspection of 473 children from different kindergartens in Moscow we can make the conclusion that log-normal is regularity inherent in this type of damage of lymphocytes genome. On the contrary the distribution of individuals on induced by irradiation *in vitro* lymphocytes with MN frequency in most cases must be acknowledged as normal. This distribution character points out that damage appearance in the individual (genomic instability) in a single lymphocytes increases the probability of the damage appearance in another lymphocytes. We can propose that damaged stem cells lymphocyte progenitor's exchange by information with undamaged cells — the type of the bystander effect process. It can also be supposed that transmission of damage to daughter cells occurs in the time of stem cells division.

Key words: lymphocytes, micronucleus assay, distribution of individuals on the spontaneous frequency of cells with micronucleus.