

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УДК 575.224.23

doi: 10.17223/19988591/30/8

**Н.В. Литвяков^{1,2,3}, М.В. Халюзова^{1,3}, Р.М. Тахауов^{1,4},
А.Э. Сазонов^{1,4}, Д.С. Исубакова¹, Е.В. Брониковская¹, Е.Н. Альбах¹,
М.А. Большаков³, С.А. Коростелев⁵, А.Б. Карпов^{1,4}**

¹ Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск, Россия

² Томский научно-исследовательский институт онкологии, г. Томск, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Россия

⁴ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
г. Томск, Россия

⁵ ООО «Геномед», г. Москва, Россия

Аберрации числа копий ДНК в лимфоцитах крови лиц, подвергавшихся профессиональному облучению, как потенциальный маркёр их высокой радиочувствительности

Работа выполнена при поддержке ФМБА России (государственный контракт № 56.004.14.0 от 18.02.2014 г.) и гранта РФФИ 13-04-01970.

Представлены результаты исследования вариаций числа копий – *copy number variation (CNV)*, возникающих *de novo* у работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся длительному радиационному воздействию. Исследование проведено на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы «Affymetrix» (США) «CytoScan™ HD Array». Изучена кровь 46 здоровых работников мужского пола, которые в процессе профессиональной деятельности подвергались длительному внешнему радиационному воздействию. Средняя доза внешнего облучения составила $281,7 \pm 38,7$ мЗв, медиана – 196,4 мЗв, интерквартильный размах – 160,1–288,7 мЗв. Установлено, что длительное радиационное воздействие может индуцировать в лимфоцитах крови CNV. У 19 из 46 работников в лимфоцитах крови выявлены не менее одной образовавшейся *de novo* CNV. Эти 19 работников были включены в опытную группу; работники без возникших *de novo* CNV (27 человек) включены в контрольную группу. В общей сложности у работников опытной группы обнаружено 39 индуцированных *de novo* CNV различных типов. Из них: 11 мозаичных амплификаций, 2 мозаичные делеции, 26 CNV, отражающихся на структуре аллельных пиков и протяжённостью > 100 kbp (21 делеция и 5 амплификаций). У 9 работников общее количество протяжённых CNV было более 5. С учётом одинаковой дозы внешнего радиационного воздействия в контрольной и опытной группах

($p = 0,6785$) проведённый анализ позволяет предположить у индивидов опытной группы высокий уровень радиочувствительности, что подтверждает повышенная частота aberrантных клеток и парных фрагментов хромосом (по результатам рутинного цитогенетического анализа) у работников, имеющих индуцированные *de novo* CNV (опытная группа), по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: вариации числа копий; CNV; цитогенетические аномалии; индивидуальная радиочувствительность; низкоинтенсивное радиационное воздействие; микроматричный анализ.

Введение

При радиационном воздействии в ДНК клеток могут индуцироваться одонитевые разрывы (single strand breaks – SSB), двунитевые разрывы (double strand breaks – DSB) и ДНК-белковые сшивки [1, 2]. Большинство повреждений ДНК может быть быстро и эффективно восстановлено эндогенными системами репарации. Однако у некоторых индивидов наблюдаются нарушения системы репарации, которая оказывается не в состоянии обнаружить и / или эффективно репарировать нарушения ДНК, что приводит к высокой индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ). Нерепарированные или неправильно репарированные одонитевые и двунитевые (главным образом) разрывы ДНК способствуют формированию точковых мутаций и хромосомных aberrаций. Ионизирующее излучение, помимо индукции хорошо известных нестабильных хромосомных aberrаций (таких, как хроматидные и хромосомные фрагменты, дицентрические, кольцевые хромосомы и др.) [3], способно вызывать образование стабильных цитогенетических аномалий: транслокаций, исследуемых при помощи метода FISH (fluorescence in situ hybridization) [4, 5], крупных делеций [6] и вариации числа копий ДНК (CNV – copy number variation), которые широко представлены в геноме и связаны с генетической изменчивостью, менделевскими заболеваниями и отчасти с мультифакториальными заболеваниями [7], тем не менее могут возникать в геноме *de novo* под действием радиации [8]. CNV или несбалансированные хромосомные аномалии в основном представлены делециями и микроделециями или амплификациями хромосомных локусов (структурные CNV) или отдельных хромосом (числовые CNV). Делеции и амплификации могут влиять на экспрессию генов, как правило, при делециях экспрессия генов, локализованных в делетированном регионе, снижена, при амплификациях – повышена [9, 10]. Как полагают Х. Li с соавт. (2012), CNV могут являться одним из наиболее вероятных альтернативных механизмов, регулирующих ИРЧ. На лейкозных клетках человека, обладающих высокой радиочувствительностью, показано, что крупные CNV располагаются в геномных регионах, которые имеют функциональное значение для реализации механизмов репарации одонитевых и двунитевых разрывов ДНК, индуцируемых при радиационном воздействии. Авторы делают предположение о

том, что коррекция уровней экспрессии генов репарации ДНК за счёт делеций и амплификаций оказывает влияние на уровень радиационной чувствительности [11].

Исследования CNV давно проводятся с применением методов FISH и сравнительной геномной гибридизации (CGH – comparative genomic hybridization) (очень крупные CNV протяжённостью несколько сотен Mbp), а теперь и с помощью микроматричных технологий CGH-array и SNP-array, которые позволяют определять CNV очень малых размеров – от 2–5 kbp. Исследования возникновения *de novo* CNV под действием радиации и других генотоксических факторов – это совершенно новая область, известно лишь несколько работ в системе *in vitro*. Одна из них – это последняя работа M.F. Arlt с соавт. (2014) на культуре фибробластов. Установлена дозовая зависимость индукции CNV, частота образовавшихся *de novo* CNV статистически значимо превышала спонтанный уровень, начиная с дозы 1,5 Гр. Средний размер индуцированных радиацией CNV составил 288 kbp (2,7 kbp к 34,2 Mbp). Радиационно-индуцированные CNV располагались по всему геному, но наибольшая их концентрация отмечалась в «горячих» точках (в которых, как правило, находятся гены-супрессоры опухолевого роста и фрагильные участки хромосом) [8].

К сожалению, пока нет исследований индукции под действием радиации новых CNV в системе *in vivo* на экспериментальных животных, а также у лиц, подвергавшихся радиационному воздействию. Считается, что это технически трудно сделать в связи с низкой чувствительностью (20% мутантной ДНК) микроматричного SNP-array анализа. Предполагается, что в крови облучённых лиц частота клеток с новыми CNV будет ничтожно мала, поэтому их не удастся детектировать. Несмотря на указанные трудности, представляющиеся совершенно обоснованными с методических позиций, нами предпринята попытка исследования индукции новых CNV в клетках белой крови у лиц, подвергавшихся долговременному профессиональному облучению.

Планируя данное исследование, мы руководствовались следующими соображениями, позволяющими рассчитывать на получение обоснованных выводов:

1. Использование самых современных технологий анализа, а именно микроматрицы «CytoScan™ HD Array» («Affymetrix», США), которая обладает высокой чувствительностью (около 10% мутантной ДНК) и позволяет количественно оценивать мозаичные CNV.

2. Предполагается, что клетки с образовавшимися *de novo* CNV будут накапливаться (более 10%) и детектироваться, но только у индивидов, у которых есть нарушения системы репарации ДНК в клетках, иначе говоря, только у людей с высокой индивидуальной радиочувствительностью, и сама детекция образовавшихся *de novo* CNV в геномной ДНК крови этих индивидов будет свидетельствовать об их радиочувствительности.

Материалы и методики исследования

Характеристика обследованных лиц. Обследовано 46 здоровых работников мужского пола Сибирского химического комбината (СХК) – крупнейшего в мире предприятия атомной отрасли, которые в процессе профессиональной деятельности подвергались длительному радиационному воздействию (внешнему облучению). Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 1964 г. (с изменениями 1975–2008 гг.) и с разрешения локального этического комитета Северского биофизического научного центра ФМБА России. Получены информированные согласия от всех работников СХК, участвовавших в данном исследовании.

Средняя суммарная доза внешнего облучения обследованных лиц составила $281,7 \pm 38,7$ мЗв, медиана – 196,4 мЗв, интерквартильный размах – 160,1–288,7 мЗв, минимальная – 100,8 мЗв, максимальная – 1 379,61 мЗв. Дозы облучения работников находились в пределах плато на дозовой кривой (100–500 мЗв), когда частота цитогенетических аномалий не увеличивается с ростом дозы облучения [12]. Только трое обследованных имели суммарные дозы более 1 Зв. Данные об индивидуальных дозах γ -излучения, измеренных с помощью фотоплёночных и термолюминесцентных дозиметров, получены из отдела охраны труда, ядерной и радиационной безопасности СХК (индивидуальный дозиметрический контроль персонала проводится с момента ввода в действие основных технологических процессов с 1953 г.). Средний возраст обследованных лиц составил $59,9 \pm 1,3$ (минимальный – 45 лет, максимальный – 77 лет). Источником медицинской информации являлся архив Северского биофизического научного центра ФМБА России, который содержит медицинские документы всех обследованных работников СХК [12].

Объектом исследования служила периферическая кровь, которую брали из вены утром натощак в стерильные контейнеры «Vacurette» с гепарином и EDTA. Кровь с гепарином использовали для стандартного цитогенетического анализа, из крови с EDTA выделяли ДНК для последующего микроматричного анализа.

Цитогенетический анализ. Для всех обследованных лиц проводили стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Для постановки культуры использовали цельную кровь, которую смешивали с культуральной средой и инкубировали в культуральных флаконах при 37°C в суховоздушном термостате. Все процедуры проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного шкафа. Состав среды: 85% среды RPMI 1640, 15% эмбриональной телячьей сыворотки. В бакпечатки с 8 мл среды вносили 2 мл цельной крови и 2–2,5% фитогемагглютинаина («Sigma», США). После инкубации в течение 45 ч в культуры добавляли колхицин до конечной концентрации 0,06 мкг/мл и продолжали культивирование ещё 3 ч.

Для получения метафаз использовали общепринятую схему обработки материала: гипотонизация с помощью 0,56%-ного раствора KCl, содержащего 0,95% цитрата натрия; фиксация смесью этанола и ледяной уксусной кислоты. Рутинную окраску хромосом проводили красителем Гимза, приготовленным на фосфатном буфере. Хромосомный анализ осуществляли с помощью микроскопа «Leica DM2500» (Германия). У каждого индивида обследовали не менее 300 метафаз. Анализировали все виды аберраций хромосом, распознаваемых без кариотипирования. Из аберраций хромосомного типа – парные фрагменты, точечные парные фрагменты, кольцевые и дицентрические хромосомы, число хроматидных фрагментов; учитывали также хроматидные обмены (фигуры типа «крест») и полиплоидные клетки. Количественно результаты выражали в виде частоты аберрантных клеток и всех видов хромосомных аберраций на 100 проанализированных метафаз.

Выделение ДНК. ДНК из крови выделяли при помощи набора «QIAamp DNA Blood mini Kit» («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя (<http://www.qiagen.com/ru/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-mini-kit#resources>). «QIAamp DNA Blood mini Kit» позволяет существенно упростить выделение ДНК из крови благодаря спин-колонкам. Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре «NanoDrop-2000» («Thermo Scientific», США). Концентрация составила от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2,10\text{--}2,35$; $A_{260}/A_{230} = 2,15\text{--}2,40$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе «TapeStation» («Agilent Technologies», США) с использованием набора «Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide» («Agilent Technologies», США). Фрагменты ДНК в основном имели массу более 48 kbp. Выделенная ДНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике «Sanyo» (Япония) и использовалась для микроматричных исследований.

Микроматричный анализ. Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы «Affymetrix» (США) «CytoScan™ HD Array» (<http://www.affymetrix.com/esearch/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>). «CytoScan™ HD Array» содержит 2 млн 670 тыс. маркёров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркёров и более 750 тыс. одноклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более 36 тыс. генов. Наличие полиморфных маркёров на микроматрице позволяет также определить участки с потерей гетерозиготности (loss of heterozygosity – LOH). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе «Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G» («Affymetrix», США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 2.0» («Affymetrix», США), которая разработана специально для анализа результатов исследований на

матрице «CytoScan™ HD Array». Во всех случаях показатель snpQC выше 15. При помощи программы в хромосомах определяли CNV – делеции и амплификации (Loss и Gain) размером не менее 100 kbp. Также определялись мозаичные делеции и амплификации (LossMosaic и GainMosaic). Микрочип «CytoScan™ HD Array» позволяет выявлять мозаичные мутации с чувствительностью 10% и более мутантной ДНК на фоне нормальной. В программе «Chromosome Analysis Suite 2.0» делеция представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с двумя «полосками» на уровне 1 против 3 аллельных пиков (AA, AB, BB) в норме на уровне 2. Мозаичная делеция графически представляется 4 «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB) на уровне 1; мозаичная амплификация – 4 аллельными пиками на уровне 3 или 4 (полоски могут сливаться: AAA может сливаться с AAB, а ABB может сливаться с BBB, что свидетельствует о высокой представленности клона с мутацией); амплификация (Gain) представлена 2 аллельными пиками на уровне 3 или 4. Таким образом, «CytoScan™ HD Array» может использоваться для того, чтобы точно определить число копий всех хромосомных локусов от 0 до 4 в диплоидных клетках человека.

Статистические методы. Для выборок вычислялись M – среднее арифметическое, SE – стандартная ошибка и SD – среднее квадратичное отклонение. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни с использованием пакета прикладных программ StatSoft STATISTICA 8.0 for Windows.

Результаты исследования и обсуждение

Трудности интерпретации. Наиболее сложной проблемой при проведении исследований *in vivo* является обнаружение образовавшихся *de novo* CNV. Это связано с тем, что CNV очень широко представлены в геноме человека и представляют значительный источник генетической вариабельности и изменчивости. Как показано, CNV связаны с человеческими мультифакториальными заболеваниями, такими как восприимчивость к ВИЧ-инфекции, аутизм, шизофрения, онкологические заболевания и др. При помощи полногеномных технологий (микроматричного и NGS анализов) в 2008–2009 гг. выявлено более 38 000 CNV (> 1 kbp в размере) и много других структурных вариаций (SVs, включая уравновешенные инверсии и транслокации) [7, 13]. Намного реже встречаются CNV размером более 100 kbp. В среднем существует > 1 000 CNV в геноме человека (размером более 100 kbp), которые объясняют геномную вариабельность 4 млн пар азотистых оснований [14, 15]. Все вариации числа копий ДНК закаталогизированы в базе данных геномных вариантов (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>). В настоящий момент DGV содержит 353 126 CNV и 1 645 инверсий. CNV, включённые в базу данных DGV, составляют 29,7% человеческого генома. Все варианты CNV из базы DGV включены в программу «Chromosome Analysis Suite 2.0».

Таким образом, главная проблема заключалась в том, чтобы отличить образовавшиеся *de novo* CNV в организме обследуемого под действием генотоксических факторов (в нашем случае – длительное радиационное воздействие) от его геномных CNV, обусловленных нормальной генетической изменчивостью. Идентификация индуцированных *de novo* CNV при радиационном воздействии *in vivo* значительно отличается от экспериментов *in vitro*, когда могут быть отслежены изменения, происходящие после облучения, при сравнении генетического ландшафта до и после облучения у отдельных клеточных клонов. При исследовании индивидов, уже подвергшихся радиационному воздействию, такой подход не возможен, и возникает необходимость жёстких критериев отбора CNV, которые образовались *de novo*, и обязательное их сравнение с базой данных геномных вариантов. Нами разработаны критерии для обработки результатов микроматричного исследования и выявления образованных *de novo* CNV.

Все CNV рассмотрены и проанализированы «вручную». При этом не рассматривались CNV в теломерных и прецентромерных районах хромосом, так как в этих районах особенно высока частота CNV из базы DGV (нормальная генетическая изменчивость). Кроме того, возможны небольшие технические сбои при сканировании полиморфных и неполиморфных маркёров в этих регионах, которые могут обуславливать появление при анализе ложноположительных CNV.

В качестве образовавшихся *de novo* CNV под действием ионизирующего излучения всегда признавались мозаичные делеции и амплификации, которые имели 4 аллельных пика. Мозаичность означает, что суммарная ДНК крови содержит и нормальную ДНК, и ДНК клеток с мутацией (делецией или амплификацией кого-либо локуса). При наличии мозаичной CNV микроматрица позволяет количественно определить частоту мутантной ДНК на фоне нормальной.

Рассматривались только CNV размером более 100 kbp, они встречаются намного реже, чем CNV размером от 1 kbp. Считается, что в норме у человека менее 2–5 таких CNV. Большее их количество, как правило, может свидетельствовать о внешнем генотоксическом воздействии или происхождении данного индивида в результате родственных связей, это может наблюдаться в отдельных этнических группах, редко встречается как артефакт [15]. Если у обследованного работника СХК в крови наблюдалось более 5 CNV размером от 100 kbp, эти CNV рассматривались как кандидаты на происхождение *de novo*.

Образовавшиеся *de novo* CNV обязательно должны отражаться на структуре аллельных пиков (должно происходить явное сужение при делеции или увеличение при амплификации), а их границы не должны соответствовать известным границам CNV из базы данных DGV.

Разделение обследованных работников на группы. Согласно вышеперечисленным критериям общая когорта обследованных работников СХК, подвергавшихся облучению, была разделена на 2 группы. Если у обследо-

ванного работника находили хотя бы один участок с образовавшимся *de novo* CNV, его относили в опытную группу. Всех, у кого не найдено ни одного образовавшегося *de novo* CNV, относили в контрольную группу. В контрольную группу включено 27 человек, в опытную – 19 человек. Из них с мозаичными амплификациями – 9 человек (табл. 1, рис. 1).

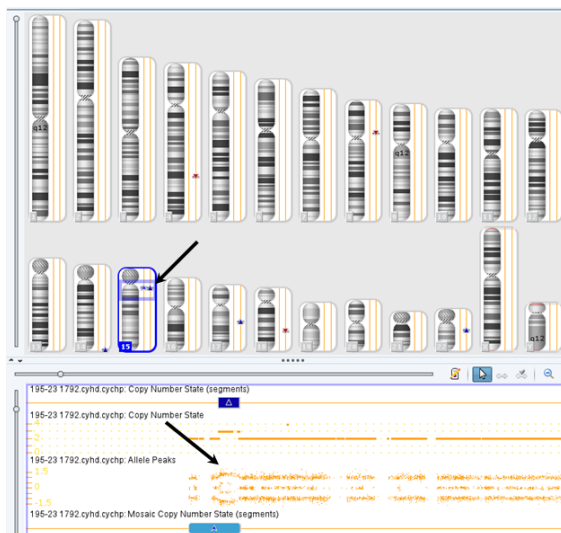


Рис. 1. Пример мозаичной амплификации 15-й хромосомы у работника #1792 (показана стрелкой)

[Fig. 1. Example of the mosaic amplification of chromosome 15]



Рис. 2. Мозаичная делеция 3-й хромосомы (показана стрелками) (работник #1490)

[Fig. 2. The mosaic deletion of chromosome 3]

Т а б л и ц а 1 [Table 1]

Хромосомная локализация, тип, размеры индуцированных *de novo* CNV и локализованные в регионе этих CNV гены
[Location, type and size of CNV. Genes located in CNV]

№	#	Тип CNV <i>de novo</i> [De novo CNV type]	Локализация [Location]	Размер, kbp [Size, kbp]	Начальный маркер [Initial marker]	Конечный маркер [Terminal marker]	Гены в локусе CAN [Genes located in CNV]
1	178	GainMosaic	22q11.23-12.1	266	S-4PCJB	C-5QBRV	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1</i>
2	203	GainMosaic	11p11.12	532	C-7FLLK	S-4VZX	<i>LOC441601, LOC646813</i>
3	278	GainMosaic	3p14.2-14.1	7727	–	S-3EXOD	<i>FHIT, PTPRG, LOC100506994, C3orf14, FEZF2, CADPS, LOC285401, SYNPR, SYNPR-AS1, SNTN, C3orf49, THOC7, ATXN7, PSMD6-AS2, PSMD6, PRICKLE2-AS1, LOC100287879, PRICKLE2, PRICKLE2-AS2, PRICKLE2-AS3, ADAMTS9, ADAMTS9-AS2, MIR548A2, MAGI1, MAGI1-AS1, SLC25A26, LRIG1, KBTBD8, MIR4272, SUCLG2, FAM19A1</i>
4	394	LossMosaic	6q12	106	S-4QPOS	S-3FDAM	No
		Loss*	5q14.3	146	S-4TGZB	C-4WQCU	No
		Loss	18q12.1	141	S-4RASA	S-3HLHI	No
		GainMosaic	22q13.31	2044	C-3EHM	S-3FVAL	<i>TBC1D22A, LOC339685, FLJ46257, MIR3201, FAM19A5, LOC284933, MIR4535, LOC100128946</i>
5	450	Loss	3p24.3	144	C-4RQHI	S-3XJXW	No
		Loss*	13q21.31	163	C-7JMKF	S-3WXXWM	No
		Loss*	5q14.3	146	S-4TGZB	C-4WQCU	No
		Loss*	13q31.1	126	S-4EESI	C-5CTOQ	No
6	620	GainMosaic	4p16.1	420	C-3DTEQ	S-3GRIX	<i>ACOX3, TRMT44, GPR78, CPZ</i>
7	743	Loss	10q21.3	256	C-6QMPB	C-4UDDJ	<i>CTNNA3, LRRTM3</i>
		Loss	11q21	230	S-4HFBU	C-4LGPB	No
8	767	Loss	18q12.1	131	C-6BEIO	S-4BCAY	No

Продолжение табл. 1 [Table 1 (continuation)]

№	#	Тип CNV <i>de novo</i> [<i>De novo</i> CNV type]	Локализация [Location]	Размер, kbp [Size, kbp]	Начальный маркер [Initial marker]	Конечный маркер [Terminal marker]	Гены в локусе CAN [Genes located in CNV]
9	792	GainMosaic Loss	10q22.1 7p21.3	134 252	C-6UNLC C-5NECB	C-6AHDO C-4STGM	<i>ADAMTS14</i> No
10	805	Gain	2q13	476	C-3FEMB	S-4DKPL	<i>RGPD5, RGPD6, LIMS3, LIMS3L, LIMS3- LOC440895, LOC440895, LOC100288570, LOC440894, MIR4267, MALL, MIR4436B2, MIR4436B1, NPHPI, LINC00116</i>
11	847	Loss*	8p11.22	238	S-3FIUN	S-4IOLS	<i>ADAM2, IDO1, IDO2</i>
		Loss	8p11.22	140	C-6IVAT	C-4LDXP	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>
		Loss	4p15.33	104	C-3MOKG	S-3AOHG	No
12	879	Loss*	13q21.31	132	C-6EDLV	C-3NSAB	No
		Loss	2p13.3	124	C-3NSAB	C-4NNNN	<i>FBXO48, APLF</i>
		LossMosaic	3q12.3-13.11	1910	C-7BPZJ	S-3CAZH	<i>ZPLD1, MIR548A3</i>
13	1490	GainMosaic	15q11.2-13.1	4188	–	C-5CDXN	<i>PWRN2, PWRN1, NPAPI, SNRPN, SNURF, SNORD107, PAR-SN, PAR5, SNORD64, Группа SNORD108-116-29 UBE3A, ATP10A, MIR4715, LOC100128714, LOC503519, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OC42</i>
		Loss	14q11.2	263	S-3KVTR	C-4TKFT	No
		Gain*	3q25.31	105	S-3NIFX	C-3YNEU	<i>LEKRI</i>
		Gain*	4q31.1	101	S-3TWJM	S-4EWRM	<i>SCOC, LOC100129858, CLGN</i>
		Gain*	7p11.2	121	S-4PGGE	C-5ZZNA	No
		Loss	22q11.23-12.1	266	S-4PCJB	C-5QBRY	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1</i>
14	1499	Gain	10q11.22	1088	C-4NTNB	C-6LQLF	<i>PYRI, LOC643650, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25G, FAM25C, AGAP9, BMSIP6, BMSIP2, FAM35B2, ANTXR1, ANXA8L2, FAM21B, CTSIP2</i>
15	1502	GainMosaic	15q11.2-12	2754	–	C-6WKMN	Группа SNORD115-116-29, UBE3A, ATP10A, MIR4715, LOC100128714, LOC503519, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OC42

О к о н ч а и е т а б л. 1 [Table 1 (end)]

№	#	Тип CNV <i>de novo</i> [<i>De novo</i> CNV type]	Локализация [Location]	Размер, kbp [Size, kbp]	Начальный маркер [Initial marker]	Конечный маркер [Terminal marker]	Гены в локусе CAN [Genes located in CNV]
16	1557	Loss	14q11.2	574	S-3NMYC	C-4MIZE	No
17	1579	Loss	14q11.2	476	C-6AXUP	S-4PHQG	No
18	1620	GainMosaic	22q11.23-12.1	269	C-6XUNK	S-3SDXV	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1</i>
		GainMosaic	15q11.2	841	C-3OXJM	C-6VPEQ	<i>PWRN2, PWRN1</i>
19	1792	GainMosaic	22q11.23-12.1	266	S-4PCJB	C-5QBRV	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1</i>
		Loss	4q28.3	364	S-3IPLP	C-4AAEA	no
		Loss	18q21.2	102	C-5ETOT	S-3BDMC	<i>LOC100505474</i>

Примечание. Loss – делеция (потеря); Gain – амплификация (усиление); GainMosaic – мозаичная амплификация; LossMosaic – мозаичная делеция; * – область CNV отсутствует в базе DGV

[Note. Loss - deletion; Gain - amplification; GainMosaic - mosaic amplification; LossMosaic - mosaic deletion; * is absent in the DGV database].

Мозаичная делеция наблюдалась у 2 работников: в 3-й хромосоме у обследованного #1490 (рис. 2, слившиеся аллельные пики) и у работника 394 в длинном плече 6-й хромосомы (см. табл. 1). Всего у 12 работников выявлены образовавшиеся *de novo* делеции, которые удовлетворяют критериям 1 (не находились в теломерных и прецентромерных районах), 3 (размером более 100 kbp) и 4 (отражались на структуре аллельных пиков и их границы не соответствовали известным границам CNV из базы данных DGV). У 9 работников общее количество CNV размером > 100 kbp более 5, во всех этих случаях отмечались протяжённые делеции или амплификации (в том числе и мозаичные), которые в соответствии с критерием 4 классифицированы как индуцированные *de novo* CNV, а эти работники отнесены в опытную группу.

Геномная локализация и размеры индуцированных *de novo* CNV. В табл. 1 представлены хромосомные локализации, тип, размеры всех индуцированных *de novo* CNV и локализованные в регионе этих CNV гены. Всего у 19 работников СХК из опытной группы обнаружено 39 индуцированных *de novo* CNV различных типов. Из них 11 мозаичных амплификаций, 2 мозаичные делеции, 21 делеция и 5 амплификаций. Средний размер индуцированных *de novo* CNV составил 714 ± 228 kbp (минимальный – 101 kbp, максимальный – 7 727 kbp). Размер амплификаций (включая мозаичные) составил $1\,333 \pm 514$ kbp, размер делеций (включая мозаичные делеции) – 284 ± 78 kbp (p -value = 0,02 по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни). Чаше возникают делеции, но их протяжённость статистически значимо меньше, чем амплификаций.

Индуцируемые *de novo* CNV распределены по геному и отмечаются во многих хромосомах (за исключением 1, 9, 12, 16, 17, 19, 20 и 21-й хромосом, что связано с малочисленностью выборки), в половых хромосомах CNV не учитывались. Наибольшая частота индуцируемых CNV отмечена в 22-й хромосоме (5 из 39), причём из них 4 случая выявлено в локусах 22q11.23-12.1. В трех случаях гены (*IGLL3P*, *LRP5L*, *CRYBB2P1*), локализованные в этом регионе, оказываются амплифицированы, в одном случае – делетированы. В 3-й и 4-й хромосомах – по 4 CNV. Как показал M.F. Arlt с соавт. (2014), радиационно-индуцированные CNV в геноме фибробластов, подвергавшихся облучению, располагались по всему геному, но концентрировались в «горячих точках», где расположены ломкие участки хромосом. Наибольшая концентрация возникающих *de novo* CNV наблюдалась в 3, 7 и 15-й хромосомах [8], что несколько отличалось от нашего распределения.

Таким образом, несмотря на то, что есть некоторые районы, более подверженные образованию *de novo* CNV, можно полагать, что возникновение CNV носит стохастический характер. Это свидетельствует в пользу радиационной природы возникновения новых CNV.

Сравнение частот цитогенетических аномалий в опытной и контрольной группах. Чтобы утверждать, что детекция образовавшихся

de novo CNV в геномной ДНК крови работников, подвергавшихся радиационному воздействию, свидетельствует об их высокой радиочувствительности, надо показать (хотя бы косвенно) повышенный уровень радиочувствительности этих индивидов. Опытная и контрольная группы не различались по суммарной дозе внешнего облучения ($p = 0,6785$ по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни). Один из возможных способов, который косвенно может показать радиочувствительность индивида, – это обнаружение повышенного уровня цитогенетических аномалий в лимфоцитах крови, определяемых при помощи стандартного метода, при равных дозовых нагрузках. Проведено сравнение частоты хромосомных аберраций в опытной и контрольной группах работников СХК (табл. 2). Установлено, что в лимфоцитах крови работников из опытной группы, где детектировались индуцированные *de novo* CNV, более чем в 2 раза выше частота aberrантных клеток и в 3 раза выше частота парных фрагментов.

Т а б л и ц а 2 [Table 2]

Частота хромосомных аберраций, выявляемых при помощи стандартного цитогенетического исследования в опытной и контрольной группах работников СХК, подвергавшихся длительному радиационному воздействию
[The frequency of chromosomal aberrations in the cohort of Siberian Group of Chemical Enterprises employees exposed to long-term irradiation]

Показатель [Indicator]	Частота хромосомных аберраций на 100 клеток ($M \pm SE$) [The frequency of chromosomal aberrations/100 cell]		p-value
	Опыт [Case]	Контроль [Control]	
Количество aberrантных клеток [Number of aberrant cells]	8,40±2,18	3,80±0,99	0,0082
Хроматидные фрагменты [Chromatid fragments]	1,13±0,39	0,70±0,25	0,6232
Парные фрагменты [Pair fragments]	1,82±0,32	0,60±0,13	0,0036
Кольца [Rings]	0,17±0,11	0,07±0,04	0,8798
Дицентрики [Dicentric]	0,07±0,07	0,03±0,03	0,9698

Примечание. М – средняя арифметическая, SE – ошибка средней, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, p-value – уровень статистической значимости, определяемый при помощи непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни

[Note. M - mean, SE - standard error, p-value - determined by Wilcoxon-Mann Whitney test].

Таким образом, с учётом одинаковых доз облучения в контрольной и опытной группах, проведённый цитогенетический анализ позволяет предполагать у индивидов опытной группы повышенный уровень радиочувствительности. В отличие от нестабильных хромосомных аномалий, выяв-

ляемых при помощи рутинного цитогенетического исследования, которые очень быстро элиминируются после радиационного воздействия, аберрации числа копий ДНК стабильны и могут длительное время поддерживаться клонами мутированных клеток (например, костного мозга) в организме.

В настоящее время известно 4 основных механизма возникновения CNV: NAHR (nonallelic homologous recombination – неаллельная гомологичная рекомбинация), NHEJ (nonhomologous end-joining – негомологичное соединение концов), Line1-опосредованная ретротранспозиция и FoSTeS (fork stalling and template switching – остановка вилки репликации и изменение матрицы) [7]. NAHR, как правило, происходит в мейозе и приводит к конститутивным геномным транслокациям, которые могут не оказывать существенного влияния на адаптивные возможности организма или проявляться как возникающие *de novo* геномные нарушения [16]. В редких случаях NAHR может также встречаться и при митозе (например, при восстановлении разрывов ДНК при воздействии радиации); в результате образуются мозаичные группы соматических клеток, несущие CNV [17, 18]. NHEJ – один из основных механизмов, которые используются клетками человека для восстановления DSB после воздействия радиации или активных форм кислорода. NHEJ не требует субстратов с гомологией, в отличие от NAHR, и практически всегда оставляет «информационный рубец» в виде делеций или дупликаций нескольких нуклеотидов в месте соединения [19], т.е. механизм NHEJ способен образовывать только очень короткие CNV. J. Xing с соавт. (2009) показали, что механизм Line1-опосредованной ретротранспозиции отвечает примерно за 10% *in/del* коротких вариаций в геноме, что показывает важную роль автономного транспозона Line1 в формировании индивидуальной структурной вариабельности генома человека [20].

Считается, что одним из основных механизмов возникновения CNV является FoSTeS, который приводит к образованию крупных амплификаций, делеций и сложных транслокаций вплоть до перестановок целых экзонов и дупликаций генов. Этот основанный на репликации ДНК механизм FoSTeS может быть ответствен за эволюционные изменения генома, появление новых функций генов, единовременные патологические изменения генома, а также может приводить к сложным сегментарным дупликациям или структурным CNV в ответ на воздействие факторов внешней среды [21–23]. Образование новых CNV под действием радиации обеспечивается благодаря SSB и репликативному стрессу. Если репликативная вилка сталкивается с SSB, вилка может привести к коллапсу репликации, новым репликативным вилкам и образованию одностороннего DSB [24]. Ионизирующее излучение индуцирует SSB в 20 раз чаще, чем DSB [2], и они, несомненно, вмешиваются в репликацию, создавая новые репликативные вилки, обеспечивая функционирование механизма FoSTeS и образование новых CNV под действием радиации [8].

Новые CNV (в том числе и благодаря механизму FoSTeS) могут образовываться и в клетках организма человека, подвергающегося радиацион-

ному воздействию, если воздействию подвергаются митотически активные клетки, например клетки костного мозга. Можно предположить, что клетки с образовавшимися *de novo* CNV при длительном радиационном воздействии будут формировать клоны в костном мозге и их потомки лейкоциты будут накапливаться в крови облучённых лиц в количествах, достаточных для детекции при помощи микроматричного анализа высокой плотности. CNV, с одной стороны, могут отвечать за генетическую компоненту индивидуальной радиочувствительности, обеспечивая вариабельность системы репарации; с другой стороны, CNV могут возникать *de novo* под действием радиации и фактически отражать чувствительность организма (или его способность к репарации) к SSB.

Заключение

Таким образом, показано наличие в лимфоцитах крови 19 из 46 обследованных работников СХК, подвергавшихся длительному радиационному воздействию низкой интенсивности, крупных CNV (средний размер CNV составил 714 ± 228 kbp, минимальный – 101 kbp, максимальный – 7 727 kbp), образовавшихся *de novo* (мозаичных амплификаций и делеций, крупных делеций и амплификаций) и распределённых по геному. В группе работников, имеющих индуцированные *de novo* CNV, выявлена повышенная частота aberrантных клеток и парных фрагментов хромосом в лимфоцитах периферической крови по сравнению с группой работников, не имеющих индуцированные *de novo* CNV, при этом обследованные группы не различались по суммарной дозе радиационного облучения. Это позволяет предположить повышенный уровень радиочувствительности у работников СХК с индуцированными *de novo* CNV, которые могут детектироваться даже при невысоких уровнях облучения и, таким образом, служить маркёром высокой радиочувствительности.

Литература

1. Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to CNACer treatment // DNA repair. 2007. Vol. 6 (7). P. 923–935.
2. Ward J. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability // Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 1988. Vol. 35. P. 95–125.
3. Luchnik N., Sevankaev A. Radiation-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes. I. Dependence on the dose of gamma-rays and an anomaly at low doses // Mutat Res. 1976. Vol. 36 (3). P. 363–377.
4. Hoffmann G.R., Sayer A.M., Joiner E.E., McFee A.F., Littlefield L.G. Analysis by FISH of the spectrum of chromosome aberrations induced by X-rays in G0 human lymphocytes and their fate through mitotic divisions in culture // Environ. Mol. Mutagen. 1999. Vol. 33 (2). P. 94–110.
5. Снугирева Г.П. Биологическая дозиметрия на основе цитогенетического анализа // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи. 2011. Т. 1, № 11. 22 с.

6. Grosovsky A.J., De Boer J.G., De Jong P.J., Drobetsky E.A., Glickman B.W. Base substitutions, frameshifts, and small deletions constitute ionizing radiation-induced point mutations in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988. Vol. 5 (1). P. 185–188.
7. Zhang F., Gu W., Hurles M.E., Lupski J.R. Copy number variation in human health, disease, and evolution // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009. Vol. 10. P. 451–481.
8. Arlt M.F., Rajendran S., Birkeland S.R., Wilson T.E., Glover T.W. Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells // *Environmental and molecular mutagenesis.* 2014. Vol. 55 (2). P. 103–113.
9. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating CNACer copy number alterations with gene expression profiles // *Brief. Bioinform.* 2012. Vol. 13 (3). P. 305–316.
10. Xu Y., DuanMu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast CNACer // *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39 (2). P. 1627–1637.
11. Li X., Zhou J., Nahas S.A., Wan H., Hu H., Gatti R.A. Common copy number variations in fifty radiosensitive cell lines // *Genomics.* 2012. Vol. 99 (2). P. 96–100.
12. Литвяков Н.В., Фрейдлин М.Б., Халюзова М.В., Сазонов А.Э., Васильева Е.О., Альбах Е.Н., Исубакова Д.С., Блинов А.П., Родионова В.И., Кутько А.А., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. Частота и спектр цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014. Т. 54, № 3. С. 283–296. doi: 10.7868/S0869803114030084.
13. Dumas L., Kim Y.H., Karimpour-Fard A., Cox M., Hopkins J., Pollack J.R., Sikela J.M. Gene copy number variation spanning 60 million years of human and primate evolution // *Genome Res.* 2007. Vol. 17 (9). P. 1266–1277.
14. Conrad D.F., Keebler J.E., DePristo M.A., Lindsay S.J., Zhang Y., Casals F., Idaghdour Y., Hartl C.L., Torroja C., Garimella K.V. Variation in genome-wide mutation rates within and between human families // *Nature.* 2011. Vol. 43 (7). P. 712–714. doi:10.1038/ng.862
15. Malhotra D., Sebat J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics // *Cell.* 2012. Vol. 148 (6). P. 1223–1241.
16. Lupski J.R. Genomic rearrangements and sporadic disease // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. S43–S47.
17. Flores M., Morales L., Gonzaga-Jauregui C., Domínguez-Vidaña R., Zepeda C., Yañez O., Gutiérrez M., Lemus T., Valle D., Avila M.C. Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104 (15). P. 6099–6106.
18. Lam K.-W.G., Jeffreys A.J. Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of α -globin gene deletion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103 (24). P. 8921–8927.
19. Lieber M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283 (1). P. 1–5.
20. Xing J., Zhang Y., Han K., Salem A.H., Sen S.K., Huff C.D., Zhou Q., Kirkness E.F., Levy S., Batzer M.A. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome // *Genome Res.* 2009. Vol. 19 (9). P. 1516–1526.
21. Bi W., Sapir T., Shchelochkov O.A., Zhang F., Withers M.A., Hunter J.V., Levy T., Shinder V., Peiffer D.A., Gunderson K.L. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41 (2). P. 168–177.
22. Lee J.A., Carvalho C., Lupski J.R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders // *Cell.* 2007. Vol. 131 (7). P. 1235–1247.
23. Perry G.H., Ben-Dor A., Tsalenko A., Sampas N., Rodriguez-Revenga L., Tran C.W., Scheffer A., Steinfeld I., Tsang P., Yamada N.A. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. Vol. 82 (3). P. 685–695.

24. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001. Vol. 98 (15). P. 8241–8246.

Поступила в редакцию 14.11.2014 г.; повторно 04.05.2015 г.; принята 15.05.2015 г.

Авторский коллектив:

Литвяков Николай Васильевич – д-р биол. наук; зав. лабораторией онковирусологии Томского НИИ онкологии; с.н.с. лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск, Россия); с.н.с. лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия).

E-mail: nvlitv72@yandex.ru

Халюзова Мария Вячеславовна – м.н.с. лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия); аспирант кафедры физиологии человека и животных Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск).

E-mail: gedonna@yandex.ru

Тахауов Равиль Манихович – д-р мед. наук, проф.; директор Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия); проф. кафедры организации здравоохранения и общественного здоровья Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России (г. Томск, Россия).

E-mail: trm@sbrc.ru

Сазонов Алексей Эдуардович – д-р мед. наук; руководитель лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия); гл. н.с. центральной научно-исследовательской лаборатории, проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России (г. Томск, Россия).

E-mail: sazonov_al@mail.ru

Исубакова Дарья Сергеевна – м.н.с. лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия).

E-mail: purksung@mail.ru

Брониовская Евгения Владимировна – м.н.с. лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия).

E-mail: innahot@sibmail.com

Альбах Елена Николаевна – м.н.с. лаборатории геномной медицины Северского биофизического научного центра ФМБА России (г. Северск, Россия).

E-mail: elen-albah@rambler.ru

Большаков Михаил Алексеевич – д-р биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск, Россия); с.н.с. отдела физической электроники Института сильноточной электроники СО РАН (г. Томск, Россия).

E-mail: mbol@ngs.ru

Коростелев Сергей Анатольевич – д-р мед. наук, проф. кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (г. Москва, Россия); генеральный директор ООО «Геномед» (г. Москва, Россия).

E-mail: korostelevsa@genomed.ru

Карнов Андрей Борисович – д-р мед. наук, проф., зам. директора Северского биофизического научного центра ФМБА России по научной работе (г. Северск, Россия); проф. кафедры организации здравоохранения и общественного здоровья Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России (г. Томск, Россия).

E-mail: kab@sbrc.ru

Litviakov NM, Khalyuzova MV, Takhauov RM, Sazonov AE, Isubakova DS, Bronikovskaya EV, Albakh EN, Bolshakov MA, Korostelev SA, Karpov AB. DNA copy number variations of blood lymphocytes in people exposed to occupational irradiation as a possible marker of high radiosensitivity. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;2(30):113-133. doi: 10.17223/19988591/30/8 In Russian, English summary

Nikolai V. Litviakov^{1,2,3}, Maria V. Khalyuzova^{1,3}, Ravil M. Takhauov¹, Aleksey E. Sazonov^{1,4}, Daria S. Isubakova¹, Evgenia V. Bronikovskaya¹, Elena N. Albakh¹, Michael A. Bolshakov³, Sergey A. Korostelev⁵, Andrey B. Karpov¹

¹ Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russian Federation

² Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation

³ Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

⁴ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

⁵ GENOMED Company, Moscow, Russian Federation

DNA copy number variations of blood lymphocytes in people exposed to occupational irradiation as a possible marker of high radiosensitivity

This work presents the results of the study of blood lymphocytes DNA copy number variations (CNV) induced de novo in 46 healthy employees of the main facilities of the Siberian Group of Chemical Enterprises exposed to external irradiation in a dose range of 100-300 mSv. We performed standard cytogenetic analysis in the entire examined group and carried out microarray studies of DNA samples by cytogenetic arrays: “Affymetrix” (USA) “CytoScan™ HD Array”.

As formed de novo CNV always recognized the mosaic deletion and amplification, which had 4 allele peaks. We considered only the CNV larger than 100 kbp. All of the examined presences were divided into two groups: control group (27 people) and experienced group (19 people). We have established that the long-term irradiation can induce CNV in blood lymphocytes. We have identified at least one formed de novo CNV in blood lymphocytes in 19 of 46 workers. These 19 employees were included in the experimental group, the employees, without any de novo CNV (27 employees) were included in the control group. Total, we have found 39 induced de novo CNV of different types in the employees of the experimental group. There were 11 mosaic amplifications, 2 mosaic deletions, 21 deletion and 5 amplifications. Two employees had the mosaic deletions in 3 chromosome (the patient #1490 and #394). 26 CNV, affecting the structure of the allelic peaks and length > 100 kbp (21 deletions and 5 amplifications). We have identified 26 CNV larger than 100 kbp. The average size of induced de novo CNV, was 714±228 kbp (min – 101 kbp, max – 7,727 kbp). The size of the amplifications (including mosaic amplifications) was 1,333±514 kbp, the size of the deletions (including mosaic deletions) was 284±78 kbp (p-value = 0.02) by Wilcoxon – Mann – Whitney test).

Our analysis suggests a very high level of radiosensitivity in individuals of the experimental group, considering the same dose of external irradiation in the control and experimental groups (p = 0.6785). The increased frequency of aberrant cells and paired chromosome fragments (based on routine cytogenetic analysis) in employees, which have induced de novo CNV (experimental group) compared with the control group, confirms that.

Acknowledgments: This work was supported by the Federal Medical and Biological Agency (No 56.004.14.0) and the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant (project No 13-04-01970).

The article contains 2 Figures, 2 Tables, 24 References.

Key words: copy number variation; CNV; cytogenetic abnormalities; individual radiosensitivity; low-intensity irradiation; microarray analysis.

References

1. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to CNACer treatment. *DNA repair*. 2007;6(7):923-935. doi: [10.1016/j.dnarep.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.006)
2. Ward J. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 1988;35:95-125.
3. Luchnik N, Sevankaev A. Radiation-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes. I. Dependence on the dose of gamma-rays and an anomaly at low doses. *Mutat Res.* 1976;36(3):363-377. doi: [10.1016/0027-5107\(76\)90246-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(76)90246-3)
4. Hoffmann GR, Sayer AM, Joiner EE, McFee AF, Littlefield LG. Analysis by FISH of the spectrum of chromosome aberrations induced by X-rays in G0 human lymphocytes and their fate through mitotic divisions in culture. *Environ. Mol. Mutagen.* 1999;33(2):94-110. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)33:2<94::AID-EM2>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:2<94::AID-EM2>3.0.CO;2-E)
5. Snigireva GP. Biologicheskaya dozimetriya na osnove tsitogeneticheskogo analiza [Biological dosimetry based on cytogenetic analysis]. *The Bulletin of the Federal State Budget Establishment Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (RSCRR) of Ministry of Health Development of the Russian Federation*. 2011;1(11). 22 p. In Russian
6. Grosovsky AJ, De Boer JG, De Jong PJ, Drobetsky EA, Glickman BW. Base substitutions, frameshifts, and small deletions constitute ionizing radiation-induced point mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;5(1):185-188.
7. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009;10:451-481. doi: [10.1146/annurev.genom.9.081307.164217](https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164217)
8. Arlt MF, Rajendran S, Birkeland SR, Wilson TE, Glover TW. Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2014;55(2):103-113. doi: [10.1002/em.21840](https://doi.org/10.1002/em.21840)
9. Litviakov NV, Freidin MB, Khalyuzova MV, Sazonov AE, Vasilyeva EO, Albach EN, Isubakova DS, Blinov AP, Rodionova VI, Kutko AA, Karpov AB, Takhauov RM Chastota i spektr tsitogeneticheskikh anomalii u rabotnikov Sibirskogo khimicheskogo kombinata (Frequency and Spectrum of Cytogenetic Anomalies in Employees of Siberian Group of Chemical Enterprises). *Radiation Biology. Radioecology*. 2014;54(3):283-296. doi: [10.7868/S0869803114030084](https://doi.org/10.7868/S0869803114030084). In Russian
10. Huang N, Shah PK, Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles. *Brief. Bioinform.* 2012;13(3):305-316. doi: [10.1093/bib/bbr056](https://doi.org/10.1093/bib/bbr056)
11. Xu Y, DuanMu H, Chang Z, Zhang S, Li Z, Liu Y, Li K, Qiu F, Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(2):1627-1637. doi: [10.1007/s11033-011-0902-3](https://doi.org/10.1007/s11033-011-0902-3)
12. Li X, Zhou J, Nahas SA, Wan H, Hu H, Gatti RA. Common copy number variations in fifty radiosensitive cell lines. *Genomics*. 2012;99(2):96-100. doi: [10.1016/j.ygeno.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.11.001)
13. Dumas L, Kim YH, Karimpour-Fard A, Cox M, Hopkins J, Pollack JR, Sikela JM. Gene copy number variation spanning 60 million years of human and primate evolution. *Genome Res.* 2007;17(9):1266-1277. doi: [10.1101/gr.6557307](https://doi.org/10.1101/gr.6557307)

14. Conrad DF, Keebler JE, DePristo MA, Lindsay SJ, Zhang Y, Casals F, Idaghdour Y, Hartl CL, Torroja C, Garimella KV. Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nature*. 2011;43(7):712-714. doi: [10.1038/ng.862](https://doi.org/10.1038/ng.862)
15. Malhotra D, Sebat J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell*. 2012;148(6):1223-1241. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.039)
16. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat. Genet.* 2007;39:43-47. doi: [10.1038/ng2084](https://doi.org/10.1038/ng2084)
17. Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Domínguez-Vidaña R, Zepeda C, Yañez O, Gutiérrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC. Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(15):6099-6106. doi: [10.1073/pnas.0701631104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701631104)
18. Lam K-WG, Jeffreys AJ. Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of α -globin gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(24):8921-8927. doi: [10.1073/pnas.0602690103](https://doi.org/10.1073/pnas.0602690103)
19. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 2008;283(1):1-5. doi: [10.1038/nrm1202](https://doi.org/10.1038/nrm1202)
20. Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD, Zhou Q, Kirkness EF, Levy S, Batzer MA. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res.* 2009;19(9):1516-1526. doi: [10.1101/gr.091827.109](https://doi.org/10.1101/gr.091827.109)
21. Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat. Genet.* 2009;41(2):168-177. doi: [10.1038/ng.302](https://doi.org/10.1038/ng.302)
22. Lee JA, Carvalho C, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*. 2007;131(7):1235-1247. doi: [10.1016/j.cell.2007.11.037](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.037)
23. Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(3):685-695. doi: [10.1016/j.ajhg.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.010)
24. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(15):8241-8246. doi: [10.1073/pnas.131009198](https://doi.org/10.1073/pnas.131009198)

Received 14 November 2014;

Revised 4 May 2015;

Accepted 15 May 2015

Authors info:

Litviakov Nikolai V, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of translational Cellular and Molecular biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation; Head of department, Oncovirology Laboratory, Cancer Research Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 5 Kooperativny Str., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: nvlitv72@yandex.ru

Khalyuzova Maria V, Post Graduate Student, Department of Human and Animal Physiology, Institute of Biology, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation; junior researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunisticheskyy av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: gedonna@yandex.ru

Takhauov Ravil M, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Health Organization and Public Health, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; director, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunisticheskyy av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: trm@sbrc.ru

Sazonov Aleksey E, Dr. Sci. (Med.), Head of department, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russian Federation; Chief Researcher, Central Research Laboratory, professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Siberian State Medical University, 2g/18 Moskovsky trakt, 634050 Tomsk, Russian Federation
E-mail: sazonov_al@mail.ru

Isubakova Daria S, Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunistichesky av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: purksung@mail.ru

Bronikovskaya Evgenia V, Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunistichesky av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: innahot@sibmail.com

Albakh Elena N, Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunistichesky av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: elen-albah@rambler.ru

Bolshakov Michael A, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Human and Animal Physiology, Institute of Biology, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation; Senior Researcher, Physical Electronics Department, Institute of High Current Electronics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: mbol@ngs.ru

Korostelev Sergey A, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Organization and Management of Drug Handling I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; DG, GENOMED Company, 26 Leninskaya sloboda st., Moscow 115280, Russian Federation.

E-mail: korostelevsa@genomed.ru

Karpov Andrey B, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Health Organization and Public Health, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; deputy director, Seversk Biophysical Research Centre of the Federal Medical-Biological Agency, 87 Kommunistichesky av., Seversk 636070, Russian Federation.

E-mail: kab@sbrc.ru