

Н. П. БОЧКОВ, В. С. ЖУРКОВ, К. Н. ЯКОВЕНКО, Н. П. КУЛЕШОВ

КУЛЬТУРА ЛИМФОЦИТОВ КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ У ЛИЦ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С МУТАГЕНАМИ

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 21 VI 1974)

Важной составной частью оценки мутагенных эффектов факторов внешней среды, с которыми контактирует человек, должны являться прямые исследования на клетках человека. Для этой цели можно использовать анализ хромосомных aberrаций в культурах лимфоцитов периферической крови. Данный метод находит широкое применение при проверке на мутагенную активность различных химических, физических и биологических факторов, применяемых в медицине, промышленности, сельском хозяйстве, быту (¹). Однако до сих пор нет научно обоснованных подходов к планированию таких обследований, как определение числа индивидов для исследования из общей группы лиц, контактирующих с изучаемым фактором, и определение числа клеток, анализируемых у индивида.

В настоящей работе приводятся экспериментальные и теоретические обоснования для применения культуры лимфоцитов как тест-объекта для изучения генетических последствий у лиц, контактирующих с мутагенами.

Планирование исследований по частоте хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови лиц, контактирующих с предполагаемым мутагенным фактором, должно основываться на знании закономерностей спонтанного мутагенеза. С этой целью проводилась работа, принципы которой и первые результаты описаны ранее (^{2, 3}). Проанализировано 60 020 метафаз в 561 культуре от 437 человек. Средняя частота клеток с aberrациями хромосом составила 1,19 %, а число aberrаций хромосом на 100 метафаз 1,24. Сравнение частот хромосомных aberrаций у лиц разного возраста и пола не выявило существенных различий ни в частоте клеток с aberrациями хромосом, ни в количестве aberrаций на 100 метафаз.

Важной характеристикой мутационного процесса является распределение культур по частоте клеток с aberrациями хромосом (табл. 1). В анализ брали только культуры, в которых изучено по 100 метафаз.

Как видно из табл. 1, 96,7 % всех проанализированных культур имели частоту aberrантных метафаз в пределах от 0 до 3 %. Проверка соответствия эмпирического распределения культур по частоте клеток с aberrациями хромосом с распределениями Пуассона и биномиальное не показала достоверных отличий от обоих теоретических распределений. Средняя величина частоты клеток с хромосомными aberrациями для рассматриваемых распределений составляет 1,18 %.

План эксперимента определялся целью исследования и точностью конечного результата, задаваемой заранее, которая зависит от точности отдельных измерений и от их количества. Она выражается в процентах и определяется по уравнению

$$W = \frac{s}{m} \cdot 100,$$

где W — точность оценки, m — средняя, s — ошибка средней.

Величина s зависит от вида распределения и величины выборки. Планирование экспериментов и обработка материалов должны проводиться с

учетом соответствующего распределения. К сожалению, в настоящее время большинство методов статистического анализа разработано для величин, имеющих нормальное распределение. При обработке данных надо определить, соблюдаются ли условия, при которых распределение исследуемой величины аппроксимируется нормальным.

Т а б л и ц а 1

Распределение культур по частоте клеток с абберациями хромосом

Количество абберантных метафаз в культуре, %	Типы распределений		
	эмпирическое	теоретическое Пуассона	теоретическое биномиальное
0	160	161,9	160,8
1	201	191,1	192,0
2	105	112,7	113,5
3	44	44,3	44,3
4	11	13,1	12,8
5 и более	6	3,9	3,6
Всего	527	527,0	527,0

Выше показано, что распределение индивидов по частоте клеток с абберациями хромосом при исследовании спонтанного уровня хорошо описывается биномиальным распределением. Распределение индивидов по чувствительности к действию мутагенных агентов пока не установлено, но не исключено, что оно также будет биномиальным. Исходя из этого, определение общего числа метафаз, достаточного для оценки частоты клеток с абберациями хромосом для индивида и всей группы можно проводить с помощью расчетов биномиального распределения при заданном уровне точности. Расчеты проводятся по следующим формулам:

$$W^2 = \frac{10\,000q}{np}; \quad n = \frac{q}{p} \frac{10\,000}{W^2},$$

где W — точность оценки, p — доля метафаз с абберациями, q — доля нормальных метафаз, n — число клеток.

В руководствах по биометрии даются рекомендации, что точность оценки должна быть не ниже 5%. Однако при исследовании спонтанного уровня и действия факторов, вызывающих низкие эффекты, это требование экономически не выполнимо. Выход можно найти, введя разумные ограничения: при оценке уровня хромосомных аббераций у отдельных индивидов точность индивидуального измерения должна быть не ниже 100%, а точность суммарной оценки в исследуемой группе людей не ниже 20%.

В начале исследования необходимо определить спонтанный уровень клеток с абберациями хромосом в культурах лимфоцитов здоровых доноров, не контактировавших с известными или предполагаемыми мутагенами. Применяя приведенные формулы, можно установить минимальное число метафаз на один индивид и минимальное число лиц в группе при заданных уровнях точности оценки. В табл. 2 приведены результаты подобных расчетов для найденной в нашем исследовании частоты клеток с абберациями хромосом 1,19%.

Объединение индивидов в группы следует проводить, вычисляя 95% доверительный интервал для каждого индивида, исходя из биномиального распределения. Если доверительные интервалы взаимно перекрываются, то всех индивидов объединяют и суммарную оценку сравнивают по критерию χ^2 со спонтанным уровнем хромосомных аббераций, полученным в данном исследовании. Если эти оценки существенно не различаются, то в дальнейшем можно пользоваться нашими данными. Если они различа-

ются, то необходимо использовать собственные данные, и в дальнейшем в каждом новом исследовании определять спонтанный уровень.

При работе с группами людей, контактирующих с изучаемыми факторами, необходимо оценить частоты клеток с абберациями хромосом, при которых будет считаться доказанным мутагенное действие фактора (например, двухкратное превышение спонтанного уровня или 3% уровень клеток с абберациями хромосом).

Т а б л и ц а 2

Количество клеток, анализируемых на 1 индивид и на группу, и общее число индивидов в группе при разных уровнях точности отдельных измерений

Точность индивидуального измерения, %	Число клеток на 1 индивид	Общее число клеток на 1 группу	Число индивидов в группе
$M = 1,19\%; p = 0,0119$			
91,4	100	2076	21
75	150	2076	14
50	333	2076	7
$M = 2,5\%; p = 0,025$			
75	70	975	14
62,5	100	975	10
50	156	975	7
$M = 3,0\%; p = 0,030$			
75	60	809	14
56,9	100	809	8
50	130	809	7

Пр и м е ч а н и е. Точность оценки для группы равна 20% во всех случаях.

В табл. 2 приведено количество клеток, которое надо проанализировать на 1 индивид, и число индивидов в исследуемой группе при разных уровнях заданной точности измерений. Объединение индивидов в группы для суммарной оценки проводится по тем же принципам, что и для спонтанного уровня.

Для правильной оценки частоты хромосомных аббераций в изучаемой группе необходимое для исследования количество индивидов определяется также величиной группы (количество людей на заводе, в лаборатории, группа больных и т. д.). Расчеты репрезентативности выборки показали⁽⁴⁾, что надо исследовать 7 индивидов для группы из 10 человек, 16 — для группы из 50 человек, 19 — для группы из 100 человек, 23 — для группы из 500 человек и более.

Все выше рассмотренные правила использования культуры лимфоцитов как тест-объекта справедливы только при условии фиксации культур в первом после стимуляции митозе (50–60 час. культивирования). Как показано, при воздействии понижующими излучениями и химическими мутагенами при более поздних фиксациях меняется частота и спектр хромосомных аббераций^(5, 6).

Институт медицинской генетики
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
12 VI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Н. Комаров, Хроника Всемирной орг. здравоохранения, т. 28, № 3, 163 (1974).
² Н. П. Бочков, Н. П. Кулешов, В. С. Журков, Цитология, т. 14, № 10, 1267 (1972).
³ Н. Р. Вощков, Humangenetik, v. 16, № 1–2, 159 (1972). ⁴ А. М. Длин, Математическая статистика в технике, М., 1958. ⁵ Н. П. Бочков, Хромосомы человека и облучение, М., 1971. ⁶ Т. Г. Селезнева, Н. П. Корман, Генетика, т. 9, № 11, 112 (1973).