

Н.О. Мазник,
Т.С. Сипко,
В.А. Вінніков

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України, Харків

Цитогенетичні ефекти в лімфоцитах людини при гамма-опроміненні *in vitro* в діапазоні високих доз

Cytogenetic effects in human lymphocytes
at high-dose *in vitro* gamma-irradiation

Цель работы: Установить особенности формирования картины цитогенетических повреждений и её вариабельность в лимфоцитах крови человека при действии гамма-излучения *in vitro* в диапазоне высоких доз — до 20 Гр.

Материалы и методы: Цельную периферическую кровь человека подвергали воздействию гамма-излучения ^{60}Co *in vitro* в дозах 2, 4, 6, 8, 10, 16 и 20 Гр при мощности дозы 1 Гр/мин. На экспериментальных точках 2, 4 и 6 Гр использовали кровь 2–3 доноров, с соответствующим необлученным контролем от каждого. Лимфоциты культивировали по стандартной методике. При цитогенетическом анализе препаратов, окрашенных флуоресцентным-плюс-Гимза методом, определяли все виды aberrаций хромосом в нормоплоидных метафазах гарантированно первого митоза. При статистической обработке данных оценивали среднюю частоту различных видов aberrаций; распределения aberrаций по клеткам характеризовали по отношению дисперсии к среднему и *u*-тестом Папворта. Сравнение средних значений цитогенетических показателей проводили *t*-критерием Стьюдента для несвязанных явлений.

Результаты: В облученных лимфоцитах происходило дозозависимое возрастание частоты aberrаций хромосом, преимущественно за счет перестроек хромосомного типа. Частота дигентриков с сопутствующим фрагментом достоверно повышалась при возрастании поглощенной дозы на каждые 2 Гр в диапазоне от 0 до 10 Гр, и так же — в интервалах 10–16 и 16–20 Гр. Кроме того, наблюдалось умеренное, но достоверное возрастание частоты хроматидных повреждений, вклад которых в суммарный уровень aberrаций составлял 2–6 % на всех дозовых точках.

Распределение aberrаций хромосомного типа по клеткам на всех точках было близким к Пуассоновскому, с тенденцией к недодисперсности (в частности — для дигентриков) в интервале доз 6–16 Гр. Вариабельность выхода цитогенетических повреждений в клетках разных доноров в контроле и на точках 2, 4 и 6 Гр оказалась умеренной; наименьшие межиндивидуальные расхождения наблюдались по частоте дигентриков с сопутствующим фрагментом.

После облучения в дозе 20 Гр все метафазы были перегружены хромосомными повреждениями — от 13 до 67 aberrаций в одной клетке, что усложняло их анализ. Вследствие этого возникли расхождения в оценке разных операторов по частоте хроматидных aberrаций (50–113 на 100 клеток), несколько меньше — для свободных ацентриков (1000–1148 на 100 клеток). Однако оценки выхода дигентриков оказались очень близкими (1442–1450 на 100 клеток).

Выводы: Впервые для Европы и США в условиях эксперимента *in vitro* были установлены особенности картины цитогенетических эффектов в лимфоцитах крови человека при действии гамма-излучения в диапазоне высоких доз — до 20 Гр. Междонорская вариабельность и расхождения оценок разных операторов для радиационной индукции дигентриков оказались умеренными, а именно такими, что перекрывались дисперсией, связанной со стохастической природой показателя. Это указывает на правомочность широкого использования кривых доза-эффект *in vitro* для хромосомной дозиметрии, а полученные данные способствуют построению эмпирической калибровочной кривой с охватом широкого диапазона клинически значимых радиационных доз.

Ключевые слова: aberrации хромосом, дигентрики, культура лимфоцитов, облучение в высоких дозах.

Objective: To determine the peculiarities of forming the picture of cytogenetic lesions and its variability in human blood lymphocytes at exposure to high-dose (up to 20 Gy) γ -radiation *in vitro*.

Material and Methods: The whole human peripheral blood was exposed *in vitro* to ^{60}Co radiation at a dose of 2, 4, 6, 8, 10, 16 and 20 Gy (dose rate of 1 Gy/min). At experimental points 2, 4 and 6 Gy the blood of 2–3 donors was used with the respective non-irradiated control from each person. Lymphocytes were cultivated using a standard technique. All types of chromosomal aberrations in normoploid metaphases of the first mitosis were determined by cytogenetic analysis of the specimens stained according to fluorescent + Giemsa method. Statistical processing of the data was used to assess mean frequency of various types of aberrations. Cell distribution of aberrations was characterized according to ratio of dispersion to mean and using Papworth *u*-test. Mean values of cytogenetic parameters were assessed using Student's *t*-criterion for independent phenomena.

Results: Dose-dependent increase of aberration frequency chiefly due to the lesions of chromosomal type occurred in the irradiated lymphocytes. The frequency of dicentric with an accompanying fragment significantly increased at increase of the absorbed dose per each 2 Gy within the range from 0 to 10 Gy and similarly within the range of 10–16 and 16–20 Gy. In addition, moderate but significant increase of the frequency of chromatid lesions occurred, their contribution to the total level of aberrations was 2–6% at all dose points. Distribution of chromosomal aberrations in the cells at all point was close to Poisson with the tendency to lack of dispersion (in particular for dicentric) in the dose interval 6–16 Gy. Variability of cytogenetic lesions output in the cells of various donors in the controls and in points of 2, 4 and 6 Gy was moderate. The lowest individual discrepancies were noted for the frequency of dicentric with an accompanying fragment. After irradiation at a dose of 20 Gy all metaphases were overloaded with chromosomal lesions, from 13 to 67 aberrations per one cell, which complicated their analysis. This resulted in discrepancies in the assessment of different operators as to the frequency of chromatid aberrations (50–113 per 100 cells), being less pronounced for free dicentric (1000–1148 per 100 cells). The values of dicentric output were very close (1442–1450 per 100 cells).

Conclusion: For the first time in Europe and the USA, the peculiarities of cytogenetic effect in human blood lymphocytes were established during *in vitro* experiment at exposure to high-dose γ -radiation (up to 20 Gy). Inter-donor variability and divergence of the assessment by different operators for radiation induction of dicentric were moderate, namely they were interrupted by dispersion associated with stochastic nature of the parameter. This indicated the possibility of a wide use of dose-effect curves for chromosomal dosimetry *in vitro*. The obtained findings allow to build an empiric calibration curve covering a wide range of clinically significant radiation doses.

Key words: chromosomal aberrations, dicentric, lymphocyte culture, high-dose irradiation.

Мета роботи: Встановити особливості формування картини цитогенетичних пошкоджень та її варіабельність у лімфоцитах крові людини при дії гамма-випромінювання *in vitro* в діапазоні високих доз — до 20 Гр.

Матеріали і методи: Цільну периферичну кров людини піддавали дії гамма-випромінювання ^{60}Co *in vitro* в дозах 2, 4, 6, 8, 10, 16 і 20 Гр при потужності дози 1 Гр/хв. На експериментальних точках 2, 4 і 6 Гр використовували кров 2–3 донорів, з відповідним неопроміненим контролем від кожної особи. Лімфоцити культивували за стандартною методикою. При цитогенетичному аналізі препаратів, забарвлених флуоресцентним-плюс-Гімза методом, визначали всі види аберації хромосом у нормоплоїдних метафазах гарантовано першого мітозу. При статистичному опрацюванні даних оцінювали середню частоту різних видів аберацій; розподіл аберацій по клітинах характеризували за відношенням дисперсії до середнього та u -тестом Папворта. Порівняння середніх значень цитогенетичних показників проводили за t -критерієм Стьюдента для незв'язаних явищ.

Результати: В опромінених лімфоцитах відбувалося дозозалежне зростання частоти аберацій хромосом, переважно за рахунок пошкоджень хромосомного типу. Частота дицентриків із супутнім фрагментом вірогідно підвищувалася при зростанні поглиненої дози на кожні 2 Гр в діапазоні від 0 до 10 Гр, і так само — в інтервалах 10–16 і 16–20 Гр. Крім того, відбувалося помірне, але вірогідне зростання частоти хроматидних пошкоджень, внесок яких до сумарного рівня аберацій становив 2–6 % на всіх дозових точках.

Розподіл аберацій хромосомного типу по клітинах на всіх точках був близьким до Пуассонівського, з тенденцією до недисперсності (зокрема — для дицентриків) в інтервалі доз 6–16 Гр. Варіабельність виходу цитогенетичних пошкоджень в клітинах різних донорів у контролі та на точках 2, 4 і 6 Гр виявилася помірною; найменші міжіндивідуальні розбіжності визначалися за частотою дицентриків із супутнім фрагментом.

Після опромінення в дозі 20 Гр усі метафази були переобтяжені хромосомними пошкодженнями — від 13 до 67 аберацій в одній клітині, що ускладнило їх аналіз. Внаслідок цього виникали розбіжності в оцінках різних операторів щодо частоти хроматидних аберацій (50–113 на 100 клітин), дещо менші — для вільних ацентриків (1000–1148 на 100 клітин). Натомість оцінки виходу дицентриків виявилися дуже близькими (1442–1450 на 100 клітин).

Висновки: Вперше для Європи і США в умовах експерименту *in vitro* були встановлені особливості картини цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові людини при дії гамма-випромінювання в діапазоні високих доз — до 20 Гр. Міждонорська варіабельність та розбіжність оцінки різними операторами для радіаційної індукції дицентриків виявилися помірними, а саме такими, що перекивалися дисперсією, пов'язаною зі стохастичною природою показника. Це вказує на правомочність широкого використання кривих доза–ефект *in vitro* для хромосомної дозиметрії, і отримані дані вможливають побудову такої емпіричної калібрувальної кривої з охопленням широкого діапазону клінічно-значущих радіаційних доз.

Ключові слова: аберації хромосом, дицентрики, культура лімфоцитів, опромінення у високих дозах.

Побудова кривих доза–ефект на лімфоцитах людини становить один з найважливіших етапів розвитку радіаційної цитогенетики. Саме ці дані склали важливу частину емпіричного підґрунтя для створення парадигми радіобіології, включаючи теорію фізичних, мікродозиметричних і молекулярних механізмів взаємодії рідко- та щільноіонізувальних випромінень з клітиною, механізмів репарації та реплікації ДНК протягом клітинного циклу, процесів розвитку ураження та відновлення в опромінених клітинних популяціях, тощо. Крім того, завдяки ідентичності виходу радіогенних аберацій хромосом у лімфоцитах *in vitro* та *in vivo* цитогенетичні криві доза–ефект є основою для біологічної дозиметрії, а калібрування дозової залежності *in vitro* в певних стандартних умовах є обов'язковим елементом роботи кожної сертифікованої біодозиметричної лабораторії [1].

З урахуванням такої істотної теоретичної і практичної значущості у світі було побудовано десятки дозо-ефектних залежностей для виходу радіаційно-індукованих аберацій хромосом *in vitro* для різних типів випромінень, у більшості випадків з охопленням діапазону поглинених доз від 0,25 до 3–4 Гр рідкоіонізувальних випромінень. Внаслідок існування соціального замовлення на оцінку наслідків радіаційного впливу в

низьких дозах у професійних та когортах потерпілих унаслідок ядерних випробувань, аварій на Чорнобильській АЕС і Південному Уралі, було докладено значних зусиль для визначення особливостей цитогенетичних ефектів у діапазоні малих (до 1 Гр) і надмалих доз (до 0,1 Гр). Доведено, що цитогенетичні закономірності, які діють в діапазоні середніх доз (від 0,5 до 4,0 Гр), не можна екстраполювати на діапазон низьких доз [2–5]. Проте, залишається недостатньо дослідженою специфіка ушкодження хромосомного апарату лімфоцитів людини при впливі радіації у високих дозах — понад 5 Гр ікс- і гамма-випромінювання. У світі відомі лічені приклади використання в цитогенетичних експериментах доз 6–10 Гр [6–10] і > 10 Гр [11–14].

На гостру практичну необхідність модельних експериментів у даному напрямку вказує досвід роботи з жертвами радіаційних аварій та інцидентів, які потерпіли від сублетальних доз опромінення [14–19]. Без досліджень *in vitro* з охопленням відповідних дозових діапазонів є неможливою правильна інтерпретація цитогенетичної картини, що супроводжує розвиток детерміністичних ефектів при дозах понад 5 Гр — гострої променевої хвороби високого ступеня тяжкості, мультиорганної дисфункції та локальних променевих уражень. Актуальність питання підкрес-

люється також тим, що опромінення у високих дозах використовується у переважній більшості протоколів променевого лікування онкологічних захворювань, і брак фундаментальних даних досі перешкоджає створенню працездатної цитогенетичної тест-системи для контролю ураження клітин нормальних тканин у хворих в умовах променевої терапії.

Метою даної роботи було встановити особливості формування картини цитогенетичних пошкоджень та її варіабельність у лімфоцитах крові людини при дії гамма-випромінення *in vitro* в діапазоні високих доз — до 20 Гр.

Методика дослідження

В експерименті використовували кров 2 жінок (вік 46 і 52 роки) і 2 чоловіків (вік 36 і 44 роки). Всі донори належали до білої раси, мали європейське походження, не проходили рентгенодіагностичних процедур щонайменше 6 місяців до забору крові, не мали онкологічних захворювань в анамнезі, не працювали у сфері дії іонізуювальних випромінень і не мали контакту з іншими шкідливими факторами виробництва (фізичні агенти, хімічні сполуки). Всі донори дали інформовану згоду на участь у експерименті, згідно з вимогами локального Комітету з етики біомедичних досліджень.

Кров забирали стерильною пункцією ліктьової вени вакуунтейнером з антикоагулянтом (Li-гепарин), в об'ємі 9 мл на кожну експериментальну точку. До моменту опромінення зразки крові утримували при температурі +37,5 °C з постійним повільним перемішуванням.

Умови опромінення *in vitro* відповідали методичним вимогам МАГАТЕ до побудови калібрувальних цитогенетичних кривих доза-ефект [1]. Опромінення виконували при кімнатній температурі від джерела ⁶⁰Co, з дистанцією між джерелом та зразками 1,5 м, при потужності дози 1 Гр/хв. Для забезпечення рівномірності опромінення вакуунтейнери було вміщено в пенопластовий блок, що забезпечувало товщину матеріалу навколо поверхні зразка крові близько 10 мм. Після опромінювання зразки крові витримували при температурі +37,5 °C з постійним повільним перемішуванням протягом 2 годин до початку культивування. Контрольні зразки крові підлягали аналогічним маніпуляціям, за винятком опромінення.

Культивування лімфоцитів крові проводили за стандартною методикою [1] у власній модифікації. Аліквоти цільної гепаринізованої крові (0,5 мл) переносили до скляних стерильних флаконів із культуральною сумішшю, яка складалася з 4 мл середовища Ігла (Gibco, UK) та RPMI 1640 (Sigma, Germany) у співвідношенні 1:1, 1 мл сироватки крові великої рогатої худоби (Gibco), 0,5 мкг/мл бромдезоксисуридину (Sigma) і 2 %-вого фітогемаглютинину (Gibco). Культури витримували в термостаті при +37,5 °C протягом 50–52 год, із додаванням 0,1 мкг/мл колхіцину в останні 4 год культивування. Після гіпотонічної обробки 0,075 М розчином KCl фіксували клітини в суміші метанолу і крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Суспензію клітин наносили на предметне скло, висушували при кімнатній температурі та забарвлювали флуоресцентним-плюс-Гімза методом (FPG) [1].

Препарати аналізували під світловими мікроскопами «Біолам-І» (ЛОМО, РФ) і Axioskop (Zeiss, Germany) при

збільшенні $\times 1000$ з масляною імерсією. До аналізу за FPG-контролем включали тільки нормоплоїдні метафази першого мітозу. В аберантних клітинах (Аб Кл) реєстрували весь спектр аберацій хромосом (А Хр), які розпізнавали при груповому каріотипуванні. Серед аберацій хромосомного типу (А Хс) реєстрували дицентричні і поліцентричні хромосоми (Диц фр), центричні кільця (ЦК), вільні ацентричні хромосомні фрагменти (Ац Фр), атипіві моноцентрики — транслокації та делетовані хромосоми (Тн). Серед аберацій хроматидного типу (А Хт) визначали хроматидні обміни (Хт Обм), хроматидні фрагменти (Хт Фр), хроматидні пробіли (Хт Пб) та ізохроматидні делеції (Іхт Дел).

При статистичному опрацюванні результатів на кожній експериментальній точці визначали середні рівні (Y) аберантних клітин, кожного виду аберацій хромосом чи їх комбінацій у розрахунку на 100 метафаз. Стандартні похибки середнього (SE) обчислювали, виходячи з дисперсії поклітинних розподілів аберацій (σ^2). Рандомізованість розподілу аберацій по клітинах (відповідність статистичі Пуассона) оцінювали за відношенням дисперсії до середнього (σ^2/Y) та u-тестом Папворта [6]. Вірогідність різниці між середніми значеннями цитогенетичних показників при порівнянні даних від різних донорів чи різних операторів визначали за t-критерієм Стьюдента для незв'язаних явищ [20].

Результати та їх обговорення

Оцінку варіабельності виходу цитогенетичних пошкоджень в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) у різних донорів було проведено в контрольних культурах і на точках з гамма-опроміненням в дозах 2, 4 і 6 Гр.

Спектри частоти цитогенетичних пошкоджень у неопроміненних лімфоцитах подано в табл. 1. Коливання спонтанного рівня Аб Кл у донорів цілком вкладалися в межі розкиду показника для дорослого населення Європи [21, 22]. У спектрі аберацій переважали Ац Фр і Хт Фр. Спорадично траплялися Диц фр, Хт Обм та Іхт Дел. Поклітинний розподіл А Хр у контрольних культурах ЛПК цілком вкладався в межі дисперсності статистики Пуассона (відношення дисперсії до середньої частоти $\sigma^2/Y \approx 1$).

Картину цитогенетичних ефектів при дії гамма-випромінення *in vitro* представлено в табл. 2–4.

Спільними рисами цитогенетичної реакції геному лімфоцитів на радіаційний вплив у всіх донорів було кількісне переважання А Хс у спектрі хромосомних пошкоджень. На всіх дозових точках сумарний рівень аберацій та різних видів аберацій хромосомного типу був істотно вищим, ніж у контролі, і в значущій кількості траплялися клітини із двома і більше А Хс, зокрема із двома хромосомними обмінами.

Таблиця 1

Варіабельність показників спонтанного хромосомного мутагенезу в клітинах першого мітозу культури лімфоцитів неопроміненої крові людини
Variability of spontaneous chromosome mutagenesis in the cells of the first mitosis of lymphocyte culture of non-irradiated human blood

Донор, стать, вік	Кількість клітин	Абсолютна кількість аберацій та їх частота $Y \pm SE$ на 100клітин							
		Аб Кл	Диц фр	Ац Фр	А Хс	Хт Обм	Хт Фр	Іхт Дел	А Хт
А, чол., 36 р.	2671	73	2	18	20	2	49	4	55
		$2,73 \pm 0,32$	$0,08 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,16$	$0,75 \pm 0,17$	$0,08 \pm 0,05$	$1,83 \pm 0,27$	$0,15 \pm 0,07$	$2,06 \pm 0,28$
Б, чол., 44 р.	1999	43	3	22	25	1	21	0	22
		$2,15 \pm 0,32$	$0,15 \pm 0,09$	$1,10 \pm 0,24$	$1,25 \pm 0,26$	$0,05 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,25$	$0,00 \pm 0,00$	$1,10 \pm 0,25$
В, жін., 46 р.	429	3	1	2	2	0	0	0	0
		$0,70 \pm 0,40$	$0,23 \pm 0,23$	$0,47 \pm 0,33$	$0,47 \pm 0,33$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Г, жін., 46 р.	290	4	0	0	0	2	1	1	4
		$1,38 \pm 0,69$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,69 \pm 0,49$	$0,34 \pm 0,34$	$0,34 \pm 0,34$	$1,38 \pm 0,69$

Примітка. Тут і далі: SE — стандартна похибка середнього, обчислена, виходячи з дисперсії поклітинного розподілу аберацій.

Таблиця 2

Рівень аберацій хромосомного типу в метафазах першого мітозу культури ЛПК людини після гострого гамма-опромінення in vitro в дозах 2–20 Гр
Aberration level of chromosome type in metaphases of the first mitosis of human PBL culture after acute in vitro gamma-irradiation at a dose of 2–20 Gy

Доза, Гр	Донор	Кількість клітин	Абсолютна кількість аберацій та їх частота $Y \pm SE$ на 100клітин				
			Кл А Хс	А Хс	Диц фр	ЦК фр	Ац Фр
2	А	390	135	177	105	5	67
			$34,62 \pm 2,41$	$45,38 \pm 3,62$	$26,92 \pm 2,75$	$1,28 \pm 0,57$	$17,18 \pm 2,08$
	Б	486	212	302	142	15	145
			$43,46 \pm 2,25$	$62,14 \pm 3,83$	$29,22 \pm 2,37$	$3,09 \pm 0,79$	$29,59 \pm 2,61$
	В	48	17	21	12	0	9
			$35,42 \pm 6,98$	$43,75 \pm 9,83$	$25,00 \pm 6,18$	$00,00 \pm 0,00$	$18,75 \pm 6,42$
4	А	365	290	565	340	25	200
			$79,45 \pm 2,12$	$154,79 \pm 6,31$	$93,15 \pm 5,08$	$6,85 \pm 1,32$	$54,79 \pm 3,71$
	В	110	98	218	130	9	79
			$89,09 \pm 2,99$	$198,18 \pm 13,97$	$118,18 \pm 11,05$	$8,18 \pm 2,93$	$71,82 \pm 8,77$
6	А	257	249	751	474	45	232
			$96,89 \pm 1,09$	$292,22 \pm 9,76$	$184,44 \pm 7,62$	$17,51 \pm 2,89$	$90,27 \pm 6,53$
	Г	74	73	236	142	14	80
			$98,65 \pm 1,35$	$318,92 \pm 22,41$	$191,89 \pm 15,36$	$18,92 \pm 4,97$	$108,11 \pm 15,84$
8	А	300	297	1524	923	105	496
			$99,00 \pm 0,58$	$508,00 \pm 13,15$	$307,67 \pm 9,76$	$35,00 \pm 3,28$	$165,33 \pm 7,80$
10	А	157	157	1018	671	64	283
			$100,00 \pm 0,00$	$648,41 \pm 18,97$	$427,39 \pm 14,42$	$40,76 \pm 4,23$	$180,25 \pm 10,97$
16	А	34	34	434	264	31	139
			$100,00 \pm 0,00$	$1276,47 \pm 38,25$	$776,47 \pm 36,09$	$91,18 \pm 17,59$	$408,82 \pm 23,27$
20	Г, оператор 1	30	30	770	435	35	300
			$100,0 \pm 0,00$	$2566,67 \pm 191,69$	$1450,00 \pm 71,72$	$116,67 \pm 16,67$	$1000,00 \pm 185,14$
	Г, оператор 2	31	31	841	447	38	356
			$100,0 \pm 0,00$	$2712,90 \pm 178,63$	$1441,94 \pm 55,22$	$122,58 \pm 15,18$	$1148,39 \pm 176,70$

Рівень аберацій хроматидного типу в метафазах першого мітозу культури ЛПК людини після гострого гамма-опромінення in vitro в дозах 2–20 Гр
Aberration level of chromatid type in metaphases of the first mitosis of PBL culture after acute in vitro gamma-irradiation at a dose of 2–20 Gy

Доза, Гр	Донор	Кількість клітин	Абсолютна кількість аберацій та їх частота $Y \pm SE$ на 100клітин			
			А Хт	Хт Обм	Хт Фр	Іхт Дел
2	А	390	11*	0	9	2
			$2,82 \pm 0,92$	$0,00 \pm 0,00$	$2,31 \pm 0,84$	$0,51 \pm 0,36$
	Б	486	23	2	21	0
			$4,73 \pm 0,96$	$0,41 \pm 0,29$	$4,32 \pm 0,92$	$00,00 \pm 0,00$
	В	48	2	0	2	0
			$4,17 \pm 2,91$	$00,00 \pm 0,00$	$4,17 \pm 2,91$	$00,00 \pm 0,00$
4	А	365	35**	1	25	9
			$9,59 \pm 1,64$	$0,63 \pm 0,63$	$6,85 \pm 1,43$	$2,47 \pm 0,81$
	В	110	8	0	6	2
			$7,27 \pm 2,49$	$00,00 \pm 0,00$	$5,45 \pm 2,18$	$1,82 \pm 1,28$
6	А	257	31 ^{ab}	11	17	3
			$12,06 \pm 2,25$	$4,28 \pm 1,38$	$6,61 \pm 1,55$	$1,17 \pm 0,67$
	Г	74	4 ^b	2	2	0
			$5,41 \pm 3,27$	$2,70 \pm 1,00$	$2,70 \pm 1,90$	$00,00 \pm 0,00$
8	А	300	44 ^{bc}	12	25	7
			$14,67 \pm 2,15$	$4,00 \pm 1,13$	$8,33 \pm 1,60$	$2,33 \pm 0,13$
10	А	157	34*	9	21*	4
			$21,66 \pm 3,42$	$5,73 \pm 1,86$	$13,38 \pm 2,87$	$2,55 \pm 1,26$
16	А	34	8	2	2	4
			$23,53 \pm 7,38$	$5,88 \pm 4,10$	$5,88 \pm 4,10$	$11,76 \pm 5,61$
20	оператор 1	30	15 ^{*,ac}	8	5	2
			$50,00 \pm 12,46$	$26,67 \pm 9,51$	$16,67 \pm 8,42$	$6,67 \pm 4,63$
	оператор 2	31	35	16	7	12
			$12,90 \pm 26,13$	$51,61 \pm 18,47$	$22,58 \pm 10,06$	$38,71 \pm 12,85$

Примітки. * — одна клітина з 2 Хт Фр; ** — дві клітини з 2 Хт Фр; ^a — одна клітина з 2 Хт Обм; ^b — одна клітина з Хт Обм і Хт Фр; ^c — одна клітина з Хт Фр та Іхт Дел.

Таблиця 4

Граничні рівні основних цитогенетичних показників і модальні класи абераційних клітин в ЛПК людини при зростанні дози опромінення
Borderline levels of main cytogenetic indices and modal classes of aberrant cells in human PBL at increase of irradiation dose

Доза опромінення, Гр	Показник							
	Диц фр			А Хс			А Хт	
	min	mod	max	min	mod	max	min	max
0	0	1	1	0	1	1	0	1
2	0	1	4	0	1	5	0	2
4	0	1–2	5	0	1–2	7	0	2
6	0	1–2	6	0	2–3	8	0	2
8	0	3–4	7	0	4–6	12	0	2
10	1	3–5	10	2	5–7	14	0	2
16	4	7–9	11	8	12–14	17	0	1
20	8	14–19	26	13	16–29	67	0	2

Примітка. min — мінімальна кількість аберацій у клітині; mod — модальні класи у спектрі абераційних клітин; max — максимальна кількість аберацій у клітині.

При опроміненні в дозі 2 Гр порівнювали вихід аберацій у клітинах донорів А, Б і В. Частота А Хс перевищувала спонтанний рівень на порядок, частота дицентриків і кілець — на два порядки. Спектри аберантних клітин у різних донорів збігалися за модальним класом (1 А Хс на клітину) і верхню межею (максимум 4–5 А Хс на клітину), а поклітинні розподіли різних видів А Хс характеризувалися рандомізованістю ($\sigma^2/Y \approx 1$). Середні рівні А Хс і Кл А Хс у ЛПК донора Б виявилися підвищеними відносно аналогічних показників у клітинах донорів А і В унаслідок вищої частоти Ац Фр. Середній вихід Диц фр в ЛПК трьох донорів перебував у вузькому діапазоні — 25–29 на 100 клітин.

При дозі 4 Гр в ЛПК донорів А і В чітко спостерігали такі спільні тенденції: хромосомні обміни кількісно переважали над виходом Ац Фр; поклітинні розподіли всіх видів А Хс вкладалися в межі дисперсності статистики Пуассона ($\sigma^2/Y \approx 1$; $u < |1,96|$); верхня межа навантаженості аберантних клітин хромосомними перебудовами становила 5 Диц фр і 6–7 А Хс. Проте у донора А спостерігався вірогідно нижчий рівень клітин з А Хс, ніж у донора В ($t = 2,63$; $p < 0,05$). При цьому тенденцію до підвищеної індукції аберацій у донора В порівняно з донором А спостерігали для всіх видів А Хс, але у випадку Ац Фр вона не досягала значущості ($t = 1,79$; $p > 0,05$), при Диц фр була на межі вірогідності ($t = 2,06$; $p < 0,05$), і тільки для суми А Хс ставала істотною ($t = 2,83$; $p < 0,01$).

Після опромінення в дозі 6 Гр спостерігали повну збіжність цитогенетичної картини в ЛПК донорів А і Г. Головними характеристиками її були: дворазове перевищення частоти Диц фр над Ац Фр, максимальна навантаженість аберантних клітин на рівні 6 Диц+ЦК фр та 8 А Хс, наддисперсний розподіл Ац Фр по клітинах (у донорів А і Г, відповідно, $\sigma^2/Y = 1,21$ і $1,69$; $u = 2,37$ і $4,22$) і тенденція до недодисперсності розподілу хромосомних обмінів по клітинах (для Диц фр у донорів А і Г, відповідно, $\sigma^2/Y = 0,81$ і $0,90$; $u = -2,21$ і $-0,62$).

Цитогенетичні ефекти радіаційного впливу в дозах 8, 10 і 16 Гр вивчали в ЛПК донора А, а 20 Гр — у клітинах донора Г. Починаючи з дози 8 Гр, при аналізі взагалі не спостерігалось клітин без аберацій. В діапазоні 8–16 Гр продовжувало

існувати дворазове перевищення середнього виходу хромосомних обмінів над Ац Фр. Максимальний ступінь аберантної обтяженості клітин поступово наростав з 7 до 11 Диц фр і з 12 до 17 А Хс. Така ж накопичувальна тенденція визначалася для модальних класів у поклітинних розподілах Диц фр та А Хс.

На точці 8 Гр дисперсність розподілів аберацій по клітинах для всіх показників вкладалася в межі, передбачені статистикою Пуассона ($\sigma^2/Y \approx 1$; $u < |1,96|$). Після опромінення в дозі 10 Гр виникала статистично вірогідна недодисперсність для Диц фр ($\sigma^2/Y = 0,76$; $u = -2,13$). Вплив гамма-променів у дозі 16 Гр приводив до недодисперсності розподілу всіх видів А Хс, яка не досягала значущості у випадку Диц фр ($\sigma^2/Y = 0,55$; $u = -1,82$), проте була цілком вірогідною для Ац Фр ($\sigma^2/Y = 0,44$; $u = -2,30$) і суми А Хс ($\sigma^2/Y = 0,38$; $u = -2,53$).

На дозах понад 10 Гр більшість метафаз виявилися мультиаберантними і досить складними для візуального аналізу та чіткої ідентифікації хромосомних перебудов (рис. 1). Особливо це стосу-

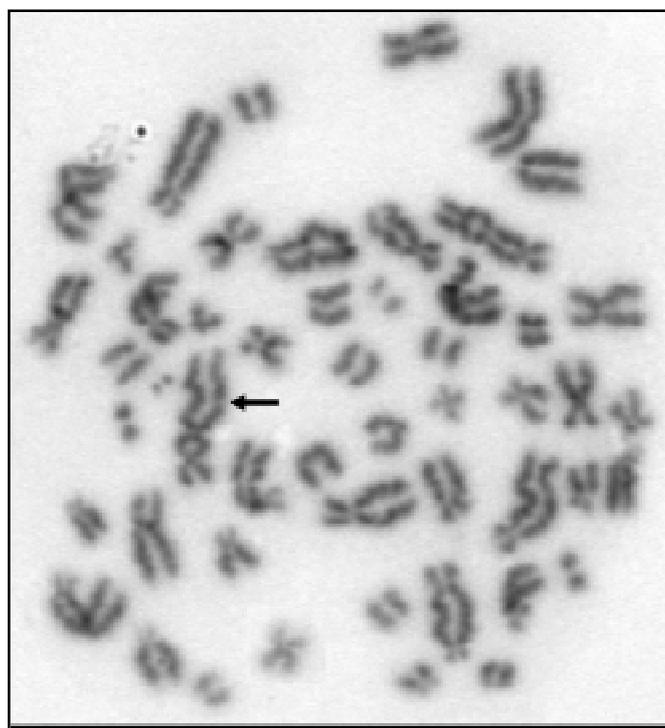


Рис. 1. Метафаза першого мітозу культури лімфоцитів крові людини після гострого гамма-опромінення в дозі 16 Гр: 8 дицентриків із супутніми фрагментами, 5 вільних ацентричних фрагментів; хроматидний пробіл в одному з дицентриків (вказано стрілкою)

Fig. 1. Metaphase of the first mitosis of human blood lymphocyte culture after acute gamma-irradiation at a dose of 16 Gy: 8 dicentric chromosomes with accompanying fragments, 5 free acentric fragments, chromatid gap in one of the dicentric chromosomes (indicated by arrow)

валося найвищої дози в експерименті — 20 Гр. З огляду на вищевикладене, було важливим порівняти результати цитогенетичного дослідження, проведеного різними операторами.

На даній точці утворювався дуже широкий спектр аберантних клітин. При цьому інтервал варіювання числа Диц фр в одній клітині виявився значно вужчим, ніж для вільних фрагментів. Поклітинний розподіл Ац Фр простягався від нульового класу (клітини без Ац Фр) до максимального значення 53 Ац Фр в одній клітині. За оцінками обох операторів поклітинні розподіли Ац Фр були наддисперсними, що викликало відповідну наддисперсність розподілів А Хс: $\sigma^2/Y = 4,15$; $u = 12,01$ за даними оператора 1, $\sigma^2/Y = 3,53$; $u = 9,80$ за даними оператора 2. Цікаво, що на фоні розтягнутості модальних класів, розподіл Диц фр мав дисперсність, яка вкладалася в межі статистики Пуассона ($\sigma^2/Y \approx 1$; $u < |1,96|$). Оцінки середніх рівнів кожного виду аберацій та суми А Хс майже збігалися, і в цілому міжоператорська варіабельність результатів хромосомного аналізу в ЛПК після дії гамма-випромінення *in vitro* в дозі 20 Гр виявилася незначною.

При порівнянні виходу аберацій хромосомного типу за різних доз опромінення визначилася чітка тенденція дозозалежного зростання для сумарного рівня А Хс та окремих їх видів. Частота А Хс і Диц фр вірогідно підвищувалася в кожному інтервалі між двома сусідніми дозовими точками в клітинах як одного, так і різних донорів ($p < 0,001$). У випадку ЦК фр ця закономірність порушувалася двічі: між точками 8 і 10 Гр ($t = 1,08$; $p > 0,05$) і точками 16 і 20 Гр ($t = 1,05-1,35$; $p > 0,05$). За частотою Ац Фр не утворювалися вірогідні відмінності в інтервалі 8–10 Гр ($t = 1,11$; $p > 0,05$).

Здатність розрізняти поглинені дози 8 і 10 Гр є важливим практичним завданням для хромосомної біодозиметрії, оскільки 8 Гр становить верхню межу інтервалу дози тотального опромінення людини (6–8 Гр), в якому є доцільною трансплантація кісткового мозку з метою лікування гострої променевої хвороби [23, 24]. Отже, за результатами нашого експерименту, найінформативнішим показником, що забезпечує надійну цитогенетичну дозиметрію в критичному інтервалі доз, виявилася частота Диц фр, за якою спостерігали вірогідні відмінності між точками

8 і 10 Гр ($t = 6,88$; $p < 0,001$). Додатково, для підсилення розрізняльної спроможності, можна запропонувати нестандартний коефіцієнт — відношення виходів Диц фр і Ац Фр, яке дорівнювало 1,86 на точці 8 Гр і 2,37 на точці 10 Гр.

Крім накопичення А Хс у досліджуваному діапазоні радіаційних доз спостерігали зростання частоти А Хт. Хроматидні аберації в лімфоцитах, експонованих у стані G_0 , традиційно вважають маркерами хімічного мутагенезу, а не радіаційного впливу [25]. Тому в публікаціях з радіаційної цитогенетики в останні 25 років ці показники майже не згадувалися. Одним з нечисленних винятків є праця [26], в якій відмічено певне підвищення рівня А Хт в ЛПК після гамма-опромінення на стадії G_0 .

У нашому експерименті відчутне зростання сумарної частоти А Хт визначалося на точці 4 Гр. У діапазоні доз 2–10 Гр у спектрі А Хт переважали Хт Фр. Починаючи з дози 6 Гр у значущій кількості з'являлися Хт Обм, а починаючи з дози 8 Гр — Іхт Дел. Означені два види хроматидних пошкоджень становили більшу частку А Хт на дозових точках 16 і 20 Гр, що відрізняло даний інтервал від картини при нижчих дозах опромінення.

Поклітинні розподіли А Хт регулярно містилися випадки виявлення двох перебудов у одній клітині, внаслідок чого виникала наддисперсність А Хт на точці 2 Гр в ЛПК донора А ($\sigma^2/Y = 1,15$, $u = 2,25$) і точці 6 Гр в ЛПК донора Г ($\sigma^2/Y = 1,45$, $u = 3,11$). При вищих дозах характер розподілу А Хт змінювався в бік недодисперсності: на точці 8 Гр $\sigma^2/Y = 0,94$, $u = -0,69$; на точці 10 Гр $\sigma^2/Y = 0,84$, $u = -1,42$; на точці 16 Гр $\sigma^2/Y = 0,77$, $u = -1,02$. При максимальній дозі опромінення — 20 Гр — поклітинний розподіл А Хт набував відповідності статистиці Пуассона ($\sigma^2/Y \approx 1$; $u < |1,96|$).

Найчіткіша тенденція до зростання з радіаційною дозою була присутня для сумарної частоти А Хт (див. табл. 3, рис. 2). Перевищення контролю за цим показником у клітинах донора А становило 1,4 разу на точці 2 Гр і поступово досягло 11,4 разу на точці 16 Гр. На точці 20 Гр оцінка ступеня перевищення контролю була ускладнена внаслідок значної варіабельності результатів від різних операторів: істотні розбіжності виявилися при порівнянні виходу Іхт Дел ($t = 2,35$;

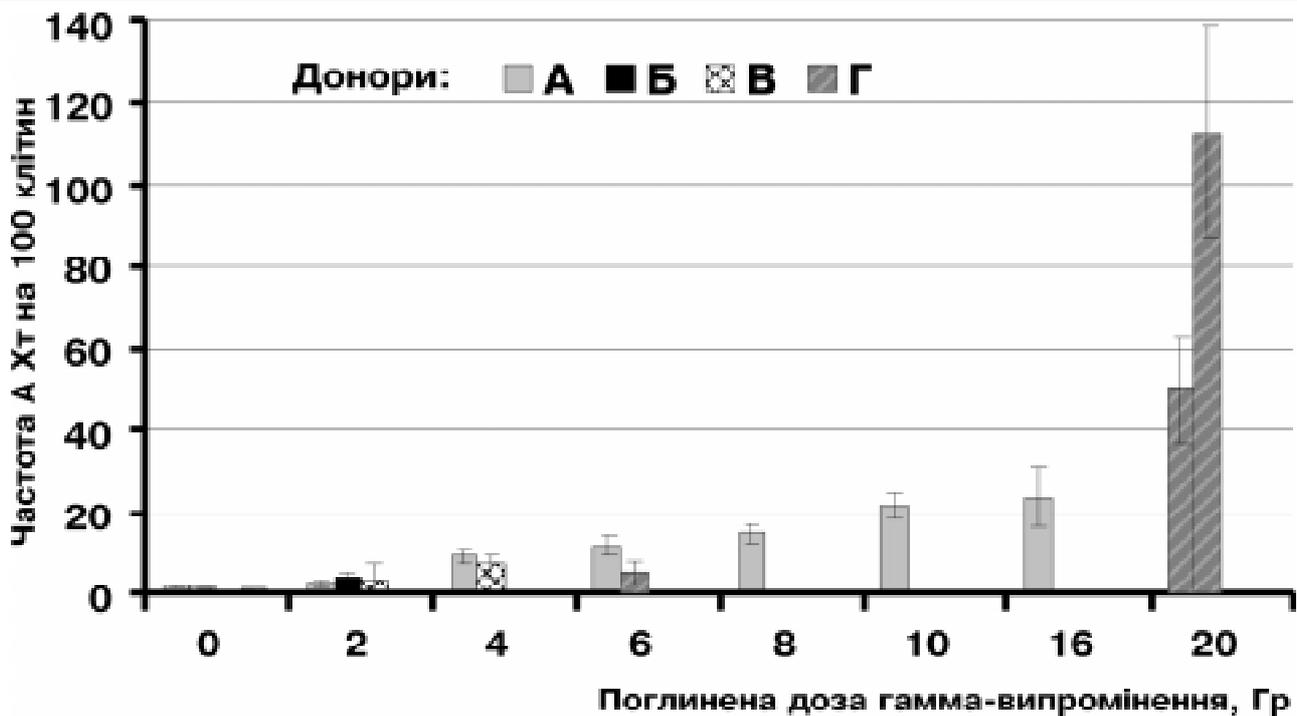


Рис. 2. Зміни сумарної частоти аберацій хроматидного типу в лімфоцитах різних донорів при зростанні дози гамма-випромінення *in vitro*. Стандартні похибки обчислені за дисперсією розподілу аберацій по клітинах. Донори вказані різною штриховкою. На точці 20 Гр представлені результати оцінки двох операторів у зразку від одного донора

Fig. 2. Changes of total aberration frequency of chromatid type in lymphocytes of different donors at increasing dose of *in vitro* gamma-irradiation. Standard errors were calculated by aberration distribution dispersion in the cells. The donors are indicated with various shading. 20 Gy point represents the results of assessment of two operators in a sample from one donor

$p < 0,05$) і суми АХт ($t = 2,17$; $p < 0,05$). За таких обставин частота АХт перевищувала відповідне контрольне значення у донора Г у 36 і 82 рази відповідно, за аналізом операторів 1 і 2.

Попри кількісну значущість радіаційної індукції АХт, вона була помірною порівняно з накопиченням АХс. При опроміненні в дозі 2 Гр рівень АХс у різних донорів перевищував частоту АХт у 10–16 разів, в дозі 4 Гр — у 16–27 разів, при вищих дозах — з 24 до 59 разів. Пропорційний внесок АХт до сумарної кількості всіх аберацій хромосом на точці 2 Гр варіював від 6 до 9%, а на інших точках ще більше знижувався і коливався у межах 2–6% без чіткої залежності від дози опромінення. Зважаючи на відомі механізми формування хромосомних пошкоджень протягом клітинного циклу, така картина являє собою результат перенасичення системи репарації ДНК двонитковими розривами, які проходять невідбудованими від фази G_0 до G_2 , де реалізуються у хроматидні аберації напередодні мітозу. Цікаво, що за дії рідкоіонізуювальних випромінь такий феномен виникає тільки при високих поглинених дозах. На відміну від цього, за опро-

мінення нейтронами, α -частками і важкими іонами навіть при низькій щільності потоку часток утворюються множинні, кластерні пошкодження ДНК уздовж треків іонізації хроматину, які погано репаруються і призводять до сумісної появи АХс і АХт в опроміненних клітинах [26–28].

Таким чином, було досліджено якісні та кількісні особливості виходу хромосомних пошкоджень у першому мітозі культури ЛПК людини після впливу гострого гамма-випромінення в діапазоні доз 2–20 Гр. Розбіжності у цитогенетичній реакції клітин різних донорів при опроміненні в однаковій дозі виявилися помірними і переважно стосувалися частоти АцФр та АХт, тоді як радіаційно-індукований рівень ДицФр у різних донорів був завжди близьким. У цілому варіабельність цитогенетичних ефектів у ЛПК людини при дії гамма-випромінення *in vitro* у високих дозах вкладалася в межі рандомізованого розподілу, близького за параметрами до статистики Пуассона ($\sigma^2/Y \approx 1$).

Результати нашої роботи цілком відповідають діапазону значень частоти ДицФр та АХс, які

спостерігали інші дослідники в експериментах з гамма-опроміненням ЛПК людини в дозах до 4–6 Гр [6–8, 29]. Що стосується порівняння цитогенетичних ефектів при гамма-опроміненні в дозах понад 10 Гр, то наше дослідження є першою вдалою спробою в Європі та США і четвертою в світі (після [12–14]). Всі оцінки частоти А Хс в інтервалі доз 16–20 Гр в означених повідомленнях і нашій роботі збігаються на якісному рівні за порядком величини (включаючи феномен недисперсності), а всі розбіжності можна віднести на рахунок відомої міжлабораторної варіабельності обліку аберацій і відмінностей у методології експериментів, наприклад, проведення аналізу в 72-годинних культурах лімфоцитів [13–14]. Це ще раз свідчить про відсутність істотних індивідуальних розбіжностей у цитогенетичній реакції ЛПК на опромінення, і тим самим — про правомочність широкого використання кривих доза–ефект *in vitro* для хромосомної дозиметрії.

Отримані дані складають підґрунтя для подальшого розвитку теорії формування радіаційно-індукованих хромосомних пошкоджень у клітинах людини. Крім того, ці результати сприяють кращому розумінню картини цитогенетичних ефектів при опроміненні у високих дозах *in vivo*. У поєднанні з отриманою раніше калібрувальною кривою у діапазоні низьких доз (до 1 Гр) [30], результати даного експерименту значно розширюють можливість коректної цитогенетичної дозиметрії у випадках аварійного опромінення.

Висновки

1. Вперше для Європи і США в умовах експерименту *in vitro* встановлено особливості картини цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові людини при дії гамма-випромінення в діапазоні високих доз — до 20 Гр.

2. У клітинах першого пострадіаційного мітозу культури опромінених лімфоцитів відбувалося дозозалежне зростання частоти аберацій хромосом, переважно за рахунок пошкоджень хромосомного типу. При дозі опромінення 2 Гр частота аберацій хромосомного типу перевищувала спонтанний рівень на порядок, частота дицентриків і кілець — на два порядки. При максимальній з досліджених доз — 20 Гр — ці показ-

ники становили відповідно близько 2500 і 1500 на 100 клітин.

3. Для радіаційної індукції дицентриків міждोनорська варіабельність та розбіжність оцінки різними операторами виявилися цілком помірними, а саме такими, що перекривалися дисперсією показника, пов'язаною зі стохастичною природою цитогенетичних ефектів.

4. При радіаційному впливі у високих дозах на додаток до стрімкого дозозалежного накопичення аберацій хромосомного типу відбувалося помірне, але вірогідне зростання частоти хроматидних пошкоджень, внесок яких до сумарного рівня аберацій становив 2–6%. Урахування цього феномену при аналізі цитогенетичної картини *in vivo* дозволить адекватніше оцінювати розмірність непрямих радіогенних ефектів — підвищеної ламкості хромосом та інших проявів нестабільності геному — за відповідних сценаріїв опромінення у високих дозах, наприклад, під час променевої терапії.

Література

1. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. IAEA Techn. Report Series № 405.* – Vienna: IAEA, 2001. – 127 p.
2. Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1992. – Vol. 61, № 3. – P. 335–343.
3. Bauchinger M. // *Mutat. Res.* – 1995. – Vol. 339. – P. 177–189.
4. Sztuńska M., Edwards A., Lloyd D. *Statistical methods for biological dosimetry; HPA-RPD-011 // Health Protection Agency (UK).* – HPA: CRCEH, 2005. – 21 p.
5. Iwasaki T., Takashima Y., Suzuki T. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, № 2. – P. 208–213.
6. Edwards A.A., Lloyd D.C., Purrott R.J. // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1979. – Vol. 16. – P. 89–100.
7. Филушкин И.В., Нугис В.Ю., Чистопольский А.С. // *Мед. радиол. Радиац. безопасн.* – 1999. – № 3. – С. 19–26.
8. Нугис В.Ю. *Цитогенетические критерии оценки дозы и равномерности острого внешнего гамма-облучения организма человека по результатам исследования культивируемых лимфоцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.01 / Гос. науч. центр – Ин-т биофиз. при Федер. упр. мед.-биол. и экстрем. проблем Министрства здравоохр. Рос. Федераци.* – М., 2003. – 37 с.
9. Hilali A., Leonard E.D., Decat G. et al. // *Radiat. Res.* – 1991. – Vol. 128. – P. 108–111.
10. Kutsuki S., Ihara N., Shigematsu N. et al. // *Radiat. Med.* – 2005. – Vol. 23. – P. 37–42.
11. Kanda R., Hayata I., Lloyd D.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75, № 4. – P. 441–446.
12. Sasaki M.S. // *Ibid.* – 2003. – Vol. 79, № 2. – P. 83–97.
13. Balakrishnan S., Shirsath K., Bhat N., Anjaria K. // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 699, № 1–2. – P. 11–16.
14. Yao B., Jiang B.R., Ai H.S. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, № 9. – P. 800–808.
15. Littlefield L.G., Joiner E.E., Colyer S.P. et al. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 1991. – Vol. 35. – P. 115–123.
16. Sevan'kaev A., Lloyd D., Edwards A. et al. // *Ibid.* – 1999. – Vol. 81. – P. 85–90.
17. Hayata I., Kanda R., Minamihisamatsu M. et al. // *J. Radiat. Res. (Tokyo).* – 2001. – Vol. 42, Suppl. – P. S149–S155.

-
18. Wojcik A., Stephan G. et al. // *Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 160, № 6. – P. 677–683.
 19. Liu Q., Jiang B., Jiang L. et al. // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. – 2008. – Vol. 49. – P. 63–69.
 20. Лакін Г.Ф. *Биометрия*. – М.: Высш. шк., 1973. – 344 с.
 21. Stephan G., Pressl S. // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 446. – P. 231–237.
 22. Чеботарев А.Н. // *Вестник РАМН*. – 2001. – № 10. – С. 64–69.
 23. Dainiak N., Waselenko J.K., Armitage J.O. et al. // *Hematol.* – 2003. – P. 473–496.
 24. Drouet M., Hérodin F. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, № 8 – P. 636–648.
 25. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. *Наследственность человека и мутагены окружающей среды*. – М.: Медицина, 1989. – 270 с.
 26. Севаньяев А.В. *Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле*. – М.: Энергоатомиздат, 1987. – 160 с.
 27. Lee R. *Chromosome aberrations in human lymphocytes irradiated with heavy ions: Ph.D. Thesis / Gesellschaft für Schwerionenforschung; Technischen Universität Darmstadt*. – Darmstadt (Germany), 2006. – 141 p.
 28. Schmid E., Roos H. // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2009. – Vol. 48, № 2. – P. 181–187.
 29. Finnon P., Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75, № 10. – P. 1215–1222.
 30. Maznyk N.A., Vinnikov V.A. // *УРЖ*. – 2004. – Т. XII, вип. 4. – С. 415–425.

Надходження до редакції 28.02.2011.

Прийнято 03.03.2011.

Адреса для листування:

Мазник Наталія Олександрівна,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна