

УДК 577.391:615.849.12:576.312.33

ХАРАКТЕР КАЛИБРОВОЧНЫХ КРИВЫХ В ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

Э.А. ДЕМИНА¹, Е.Н. ДЕМЧЕНКО¹, И.Р. БАРИЛЯК²

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45

²Научный центр радиационной медицины АМН Украины

Украина, 04050, г. Киев, ул. Мельникова, 53

e-mail: demchenko_e@mail.ru

Для выполнения цитогенетической дозиметрии и интерпретации характера калибровочных кривых в области малых доз облучения целесообразнее использовать модель линейной сплайновой регрессии. Радиопротектор инозин (рибоксин), снижая уровень радиационно-индуцированных аберраций хромосом до контрольных значений (спонтанного уровня), тем самым изменяет аномальный характер кривой “доза – эффект”.

Ключевые слова: модель сплайновой регрессии, дозиметрия, аберрации хромосом, рибоксин.

Введение. Цитогенетические методы, основанные на анализе частоты аберраций хромосом, позволяют получить количественную оценку радиационного воздействия на организм человека с учетом его индивидуальных особенностей и состояния организма в период облучения, качества и дозы ионизирующего излучения [1].

Достижениями в области количественной радиационной цитогенетики современная наука прежде всего обязана Н.В. Лучнику и его последователю А.В. Севаньяеву [2–4].

С целью реконструкции доз, полученных человеком при радиационных инцидентах, частота обменных хромосомных аберраций (дицентриков, центрических колец, транслокаций), регистрируемых в лимфоцитах крови, сопоставляется с калибровочной кривой “доза – эффект”, построенной по результатам облучения лимфоцитов *in vitro*. Мировой опыт использования теста хромосомных аберраций с целью оценки величины поглощенных доз, полученных вследствие радиационных аварий, показал его надежность, корректность и поэтому он является международным признанным методом биологической дозиметрии в случаях острого радиационного поражения – методом “первого реагирования”. При этом многочисленные дискуссии вокруг методов биодозиметрии и радиобиологии малых доз в большинстве случаев связаны со статистической обработкой полученных данных.

Наиболее популярной является так называемая линейно-квадратичная модель, развитая на основе микродозиметрических концепций, в рамках которой дозовые кривые, промежуточные между линейной и квадратичной (а та-

ковы большинство дозовых кривых, описанных в литературе), объясняются тем, что энергия, которая должна поглотиться в мишени для формирования биологического эффекта, может быть получена в результате как одного, так и двух попаданий. В связи с этим, кривые описывают уравнением $Y = \alpha D + \beta D^2 + C$ и считают, что коэффициенты, стоящие перед D и D^2 , отражают относительную роль двух механизмов. Отношение α и β дает величину λ , которая соответствует той дозе, при которой роль одно- и двухударного компонентов одинакова. Из величины λ можно, зная микрогеометрические константы данного вида излучения, определить объем мишени. Однако цитогенетические исследования последних лет хотя и не опровергают линейно-квадратичную модель, но достаточно убедительно показывают, что она в некоторых ситуациях является консервативной [5–7].

Очевидно, что оценки поглощенных доз могли быть более точными, если бы при получении калибровочных кривых учитывали индивидуальную радиационную чувствительность донора [8], а для интерпретации характера дозовых кривых использовали более динамичные математические модели [6, 7, 9]. В этой связи разработанный метод аппроксимации цитогенетической зависимости “доза – эффект” на основе линейной сплайновой регрессии приводит к более точным результатам (меньшая среднеквадратичная ошибка в сравнении с линейной и линейно-квадратичной моделями) и позволяет прогнозировать эффект выхода кривой “доза – эффект” на плато [9].

Сложность получения объективной информации о цитогенетических эффектах в области малых доз радиации заключается в сравнительно низком уровне аберраций хромосом в этом диапазоне доз. Результаты цитогенетических исследований, вы-

полненных в области низких доз облучения, достаточно противоречивы: в одних случаях выход аберраций соответствует линейной зависимости [10, 11], в других – линейно-квадратичной [12], а в третьих – отмечается более сложная зависимость [13–15]. Между тем, более тщательный анализ выполненных работ показал, что во всех случаях имела место более сложная, чем линейная или линейно-квадратичная зависимость, характеризующаяся наличием плато на дозовой кривой; при этом у разных авторов плато обнаруживалось в разных диапазонах доз. Такой аномальный характер дозовой зависимости в области низких доз сохранялся при изменении мощности дозы излучения на два порядка [16]. В некоторых из указанных работ при экстраполяции цитогенетического эффекта с высоких доз на низкие наблюдался эффект выше ожидаемого, а для дицентриков отмечали плато на дозовой кривой в диапазоне 10–30 сГр [13, 16, 17]. В работе [18], выполненной на культуре лимфоцитов человека, показано, что дозовая кривая выхода дицентриков в области исследованных малых доз (3–290 мГр) имеет четко выраженный ступенчатый характер, причем одно плато эффекта для доз 3–10 мГр лежит ниже, а другое – для доз 1–48 мГр – выше уровня контроля; различия с контролем становятся статистически достоверными только с дозой 290 мГр. Это позволяет авторам работы утверждать, что порог для выхода дицентриков находится в диапазоне 48–290 мГр.

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует об особенностях в кинетике частоты структурных перестроек в интервале доз ниже 0,5 Гр. Представляет научный и практический интерес исследовать влияние радиопротекторов на форму дозовых кривых при действии малых доз ионизирующих излучений на генетический аппарат соматических клеток человека.

Цель настоящей работы – изучить характер калибровочных кривых по уровню радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека в интервале малых доз облучения и при дополнительном действии рибоксина.

Материалы и методы

Материалом исследования были лимфоциты периферической крови 3-х здоровых доноров, культивированные стандартным методом с некоторыми модификациями, описанными нами ранее [19]. Для оценки частоты и спектра хромосомных aberrаций и построения калибровочных кривых “доза – эффект” гамма-облучение культур лимфоцитов осуществляли на терапевтическом аппарате “Рокус” с источником ^{60}Co Национального института рака МЗ Украины в диапазоне доз 0,1–1,0 Гр при мощности дозы 0,9 Гр/мин. Метафазный анализ aberrаций хромосом выполняли с элементами кариотипирования. В качестве радиопротектора в эксперименте использован инозин (рибоксин “Дарница, Украина”), который вводили в концентрации 0,01 мг/мл крови за 30 мин до облучения. Для аппроксимации зависимости цитогенетических показателей от величины дозы облучения D использованы:

линейная модель $y = \alpha D + b$;

линейно-квадратичная

модель $y = \alpha D^2 + bD + c$;

модель сплайновой регрессии

$$y = \begin{cases} a_1 D + b_1, & \text{если } D \leq D_0 \\ a_2 D + b_2, & \text{если } D > D_0 \end{cases}$$

где y – количество aberrаций хромосом на каждые 100 проанализированных метафаз; $a, b, c, \alpha_1, \alpha_2, b_1, b_2$ – коэффициенты (параметры) моделей.

Вычисление параметров линейной и линейно-квадратичной моделей проводили стандартными методами расчета параметров в схеме линейной регрессии

с помощью методов наименьших квадратов (МНК), а для вычисления параметров сплайнов использован разработанный статистический метод нелинейной регрессии, который базируется на МНК и порядковых статистиках [20]. Ошибка модели определялась остаточной суммой квадратов в результате сравнения экспериментальных и расчетных данных, полученных на основании указанной модели: чем меньше остаточная сумма квадратов, тем более точная модель.

Результаты и обсуждение

Цитогенетические данные, полученные при гамма-облучении (в интервале доз 0,1–1,0 Гр) культур лимфоцитов на G_0 -стадии митотического цикла трех условно здоровых доноров представлены на рис. 1.

Анализ полученных калибровочных кривых свидетельствует об их аномальном характере с наличием плато (дозозависимого участка) в области малых доз (0,1–0,5 Гр). При анализе индивидуальной дозовой кривой (рис. 2), построенной для конкретного донора, четко определяется плато для частоты клеток с aberrациями, общей частоты aberrаций хромосом в интервале доз 0,1–0,3 Гр.

Это может означать, что при построении калибровочных кривых целесообразно учитывать индивидуальную радиочувствительность конкретного донора, определяемую на основании G_2 -radiosensitivity assay [8]. В характере дозовых кривых в интервале изученных доз превалирует линейная компонента, что подтверждается значениями α коэффициента регрессионных уравнений (рис. 2).

При этом модель сплайновой регрессии (кусочно-линейные сплайны) существенно лучше линейной и линейно-квадратичной моделей описывает экспериментальные данные, полученные в исследуемом диапазоне доз. Улучше-

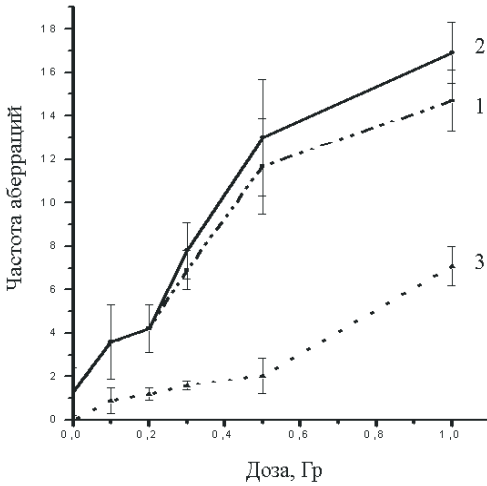


Рис. 1. Усредненные цитогенетические данные при γ -облучении культур лимфоцитов доноров в диапазоне доз 0, 1-1,0 Гр: 1 – общая частота aberrантных метафаз; 2 – общая частота aberrаций хромосомом; 3 – общая частота дигентрических хромосом

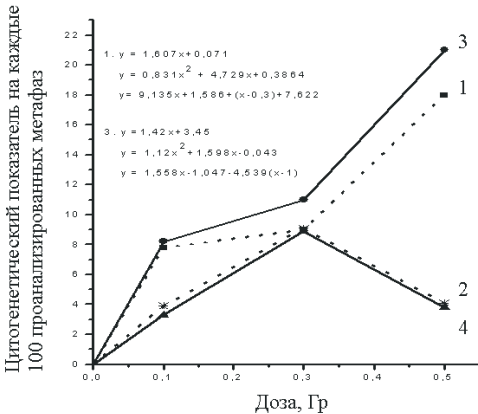


Рис. 2. Индивидуальная дозовая кривая при дополнительном действии радиопротектора рибоксина: 1 – частота aberrантных клеток; 2 – частота aberrантных клеток + P; 3 – частота aberrаций хромосомом; 4 – частота aberrаций хромосомом + P

ние качества аппроксимации достигается за счет уменьшения ошибки модели, о чем свидетельствуют результаты сопоставления качества аппроксимации экспериментальных данных моделями разной сложности и их ошибок. Например, для цитогенетического показателя частоты

ты aberrантных клеток ошибка линейной модели составила 4,5; линейно-квадратичной – 4,2; сплайновой – 3,0; для общей частоты aberrаций хромосомом ошибка линейной модели составила 2,8; линейно-квадратичной 2,7 и для сплайновой 1,6. Таким образом ошибка сплайновой модели имеет наименьшее значение для всех изученных цитогенетических показателей.

Поскольку сходные цитогенетические зависимости в области действия малых доз воспроизводятся с постоянством в независимых исследованиях [1–9, 13, 16–18 и др.], то можно считать, что такая аномальная форма кривой “доза – эффект” определяется не случайными флуктуациями, а является следствием качественных особенностей лучевых реакций генетического аппарата клеток на облучение в этом диапазоне доз.

О причинах появления плато на дозовой кривой в области малых доз высказаны следующие предположения: неоднородность популяции клеток, включение прогрессирующих с дозой репаративных процессов после монотонного увеличения числа повреждений на начальном участке дозовой кривой; существование “аварийного” типа репарации, которая включается при росте генетических повреждений при переходе кривой на плато; существование малого пула “клеток эволюционного резерва”; одновременное увеличение с ростом дозы уровня повреждений ДНК и проницаемости ядерной мембраны, способствующей экспрессии “репаративных” генов [13, 16, 21–22 и др.].

Введение рибоксина в культуру клеток до облучения снижает частоту aberrантных клеток и общую частоту aberrаций хромосом (рис. 2). Менее выраженный эффект рибоксина на цитогенетическом уровне проявляется при дозе 0,3 Гр, то есть при “выходе” кривой из плато, а максимальный радиозащитный эффект – при

дозах 0,1 и 0,5 Гр. Можно заключить, что при дозах 0,1 и 0,5 Гр рибоксин, защищая клетки от радиационно-индуцированных повреждений, “доводит уровень аберраций хромосом до верхней границы спонтанного (3/100 метафаз)”. Таким образом, “снимая” плато, радиопротектор инозин (рибоксин) изменяет аномальный ход дозовых кривых в диапазоне доз 0,1–0,5 Гр.

В экспериментальных исследованиях установлено, что препарат рибоксин является эффективным радиопротектором при различных режимах радиационного воздействия [23]. Он известен как стимулятор метаболических процессов в организме и предшественник синтеза АТФ и нуклеотидов, тем самым поддерживая энергетический баланс в различных клетках и тканях и т.д. Полученный в нашем исследовании радиозащитный эффект рибоксина на генетическом уровне соматических клеток организма человека – лимфоцитов периферической крови – мы связываем с активацией ферментативных систем и процессов репарации.

Выводы

Для выполнения цитогенетической дозиметрии облучения в области малых доз целесообразнее использовать модель линейной сплайновой регрессии, ошибка которой имеет наименьшее значение для изученных цитогенетических показателей по сравнению с другими моделями.

Предварительное введение в культуру клеток рибоксина при дозах 0,1 и 0,5 Гр гамма-облучения снижает уровень радиационно-индуцированных хромосомных повреждений вплоть до контрольных значений.

Список литературы

1. Шевченко В. А., Снигирева Г. П. Значимость цитогенетического обследования для оценки последствий Чернобыльской катастрофы //

Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46. № 2. – С. 133–139.

2. Luchnik N.V. Dose-response relation for chromosomal aberrations in irradiated human lymphocytes / Biological Effects of Low-Level Radiation. Vienna, IAEA, 1983. – P. 199–206.
3. Севаньяев А.В., Голуб Е.В., Хвостунов И.К. Ретроспективная оценка доз в отдаленный пострadiационный период разными биологическими методами // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 6. – С. 637–652.
4. Севаньяев А.В., Насонов А.П. Калибровочные дозовые кривые хромосомных аберраций в лимфоцитах человека // Мед. радиология. – 1978. – Т. 23, № 6. – С. 26–33.
5. Демина Э.А., Ключин Д.А., Петунин Ю.И., Савкина М.Ю. Определение калибровочных кривых для цитогенетических показателей на основе модели сплайновой регрессии при нейтронном воздействии на лимфоциты человека / Збірник наукових робіт “Променева діагностика, променева терапія”. – 2001. – Вип. 11. – С. 23–30.
6. Барияляк И.Р., Демина Э.А., Ключин Д.А. и др. О форме дозовых кривых радиационно-индуцированных цитогенетических повреждений лимфоцитов человека // Цитология и генетика. – 2001. – Вып. 35. – № 4. – С. 55–58.
7. Нестеров Е.Б., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераскин Р.А. Индукция цитогенетических эффектов в корневой системе облученных при разных мощностях дозы проростков ярового ячменя / Пробл. радиац. генетики на рубеже веков. – М.: Рос. Университет дружбы народов, 2000. – С. 169.
8. Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М. Індивідуальна радіочутливість людини. – К.: Логос, 2006. – 126 с.
9. Дьоміна Е.А. Радіогенні цитогенетичні ефекти у учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – К., 2002. – 36 с.
10. Lloyd D.C., Edwards A.A., Prosser I.S. et al. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis / XIX Review of cases investigated (1988–1990). New York, 1990. – 28 p.

11. Lloyd D.C., Edwards A.A., Moquet J.E. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis / XX Review of cases investigated (1991–1993). New York, 1993. – 25 p.
12. Pohl-Rüling J., Fischer P., Haas O. et al. Effect of low dose acute X-irradiation on the frequencies of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes *in vitro* // Mutat. Res. – 1983. – Vol. 110. – P. 71–82.
13. Luchnik N.V., Sevankaev A.V. Radiation-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes. 1. Dependence of the dose of gamma-rays and an anomaly at low doses // Mutat. Res – 1976. – Vol. 36, №3. – P. 363–378.
14. Севаньяев А.В., Деденков А.Н. Актуальные проблемы современной радиобиологии в свете оценки и прогнозирования последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Радиобиология. – 1990. – Т. 30, № 5. – С. 579–582.
15. Демина Э.А. Калибровочные кривые для цитогенетических показателей на основе модели сплайновой регрессии при действии нейтронов в диапазоне малых доз / Матер. III международного симпозиума “Механизмы действия сверхмалых доз”. – М.: Изд-во Рос. Университет. дружбы народов, 2002. – С. 70.
16. Севаньяев А.В. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле. – М.: Энергоатомиздат, 1987. – 160 с.
17. Репина Л.А. Цитогенетические изменения в лимфоцитах крови человека после воздействия ускоренными тяжелыми ионами, протонами и гамма-излучением ^{60}Co в низких дозах *in vitro*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2007. – 20 с.
18. Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al. Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced *in vitro* by very low doses of X-rays // Int. J. Radiat. Biol. – 1992. – V. 61. – P. 335–343.
19. Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М., Дружина М.О., Чехун В.Ф. Цитогенетичний спосіб визначення індивідуальної радіочутливості людини з метою первинної профілактики радіогенного раку / Метод. рекомендації. – К., 2007. – 28 с.
20. Ключин Д.А., Петунин Ю. И. Доказательная медицина: Применение статистических методов. – М.: Диалектика, 2008. – 315 с.
21. Спитковский Д.М., Ермаков А.В., Горин А.И. и др. Особенности внепланового синтеза ДНК и изменений структурных параметров ядер лимфоцитов человека после действия рентгеновского излучения в малых дозах и в сочетании с УФ облучением // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т. 34, № 1. – С. 23–30.
22. Luchnik N.V., Fesenko E.V., Ovchinnikova V.G. Critical periods of the mitotic cycle: influence of aminopterin and thymidine on production of chromosomal aberrations by radiation in crepis capillaries // Mutat. Res, 1976. – Vol. 34. – P. 367–388.
23. Вернигорова Л.А., Чертков К.С., Крылов К.П. / Химия, фармакология и механизм действия противолучевых средств. – М., 1990. – С. 16–17.

Представлена Л.Л. Лукаш
Поступила 11.12.2008

ХАРАКТЕР КАЛІБРУВАЛЬНИХ КРИВИХ У ЦИТОГЕНЕТИЧНІЙ ДОЗИМЕТРІЇ

Е. А. Дьоміна¹, О. М. Демченко¹, І. Р. Бариляк²

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45

² Науковий центр радіаційної медицини АМН України
Україна, 04050, м. Київ, вул. Мельникова, 53
e-mail: demchenko_e@mail.ru

Для виконання цитогенетичної дозиметрії та інтерпретації характеру калібрувальних кривих в області малих доз опромінення доцільно використовувати модель лінійної сплайнової регресії. Радіопротектор інозин (рибоксин) знижує рівень радіаційно індукованих аберацій хромосом до контрольних значень (спонтанного рівня), тим самим впливає на аномальний характер кривої “доза – ефект”.

Ключові слова: модель сплайнової регресії, дозиметрія, аберації хромосом, рибоксин.

CALIBRATION CURVES PLOTTING
IN CYTOGENETIC DOSIMETRY

*E.N. Demchenko*¹, *E.A. Dyomina*¹,
*I. R. Barilyak*²

¹ R.Ye.Kavetskyi Institute of Experimental
Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of
Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 45

² Scientific center of Radiation Medicine of MHC

Ukraine, 04050, Kyiv, Melnikova str., 53

e-mail: demchenko_e@mail.ru

The model of linear spline regression was demonstrated to be preferable for interpretation of dose dependence character at the low dose rates. Reducing the level of radiation induced chromosome aberrations radioprotector inosin (riboxin) 'abrogates' the plateau altering the abnormal character of 'dose-effect' curve that is specific for the region of low dose ionizing irradiation.

Key words: spline regression models, dosimetry, chromosome aberrations, riboxin.