

БАЗА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАНИХ ДЛЯ ПОБУДОВИ КАЛІБРУВАЛЬНИХ КРИВИХ "МАЛІ ДОЗИ - ЕФЕКТ"

О.М. Демченко, Е.А. Дьоміна, М.Ю. Савкіна

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіо-
обіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ)*

Інститут математики НАН України (Київ)

Вступ

Малі дози опромінення індують генетичні пошкодження, що відіграють критичну роль у розвитку радіаційного мутагенезу і канцерогенезу, що було підтверджено в дослідженнях, проведених серед багаточисельних груп населення, які зазнали опромінення за рахунок променевої діагностики; професіоналів, що працюють в сфері дії іонізуючих випромінювань, мешканців радіаційно забруднених територій та ліквідаторів наслідків аварії на Чорнобильській АЕС [1-4].

З метою прогнозування несприятливих наслідків на здоров'я населення необхідно вчасно і точно оцінити величину поглиненої дози радіації. Для оцінки поглинених доз радіації використовують методи біологічної дозиметрії, так як вони, на відміну від методів фізичної дозиметрії дають можливість визначення сумарного ефекту дії радіаційно-індукованого опромінення з урахуванням індивідуальної радіочутливості [5]. Біологічний метод оцінки поглинених доз радіації - це основний безальтернативний метод, який базується на дозових залежностях виходу структурних пошкоджень хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини [6]. Існує ряд критеріїв, які обумовлюють застосування методів біологічної дозиметрії, що зводяться до наступного: дозова залежність ефекту у широкому діапазоні доз; висока радіочутливість (зміна величини ефекту на одиницю дози радіації); прояв реакції, використаної як індикатор, протягом визначеного часу після опромінення; специфічність ефекту до дії іонізуючої радіації [7-10].

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Однією з небагатьох таких тест - систем є культура лімфоцитів людини. Невисокий спонтанний рівень хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові, з одного боку, і, навпроти, високий ступінь радіочутливості хромосом людини порівняно з хромосомами інших видів, з другого, дозволяють вірогідно реєструвати радіаційно - індуковані структурні ушкодження при досить низьких дозах, порядку сГр [11].

Слід зазначити, що для визначення дози радіаційно-індукованого опромінення за частотою структурних аберацій, при побудові калібрувальних кривих "доза-ефект" потрібно врахувати, помилку прогнозу поглиненої дози за певними цитогенетичними показниками, яка повинна бути мінімальною [12].

Мета роботи - отримати та оцінити цитогенетичні дані в діапазоні дії малих доз радіації з урахуванням індивідуальної радіочутливості та за допомогою методів математичного моделювання.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконано з використанням тест-культури лімфоцитів периферичної крові донорів (3 особи) з подальшим аналізом аберацій хромосом та деякими модифікаціями, описаними нами раніше. Культивування клітин проводили протягом 52 годин. Для оцінки рівня і спектру структурних перебудов хромосом та визначення їх калібрувальних кривих "доза-ефект" культуру лімфоцитів периферичної крові опромінювали γ -променями на терапевтичному апараті "Рокус", джерелом яких є ^{60}Co , з потужністю дози 0,9 Гр/хв, в діапазоні доз 0,1 - 1,0 Гр. Метафазний аналіз аберацій хромосом виконували з елементами каріотипування. Для визначення індивідуальної радіочутливості (IP) донорів культуру лімфоцитів периферичної крові опромінювали на G_2 стадії клітинного циклу [13].

Апроксимацію залежностей цитогенетичних ефектів радіаційно-індукованого опромінення проводили за допомогою моделей регресії: лінійної $y=aD+b$;

лінійно-квадратичної $y=aD^2+bD+c$;

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

де y - кількість аберацій хромосом на кожні 100 проаналі-

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

зовані метафази; $a, b, c, \alpha_1, \alpha_2, b_1, b_2$ - коефіцієнти (параметри) моделей, D_0 - точка переходу у моделі сплайнової регресії.

Похибка моделей визначається остаточною сумою квадратів отриманих в результаті порівняння експериментальних та розрахункових даних: чим менша остаточною сума квадратів, тим більш точна модель [14].

Отримані результати та їх обговорення

Результати цитогенетичних досліджень представлені в табл. 1-6. Продовжені дослідження кількісних закономірностей виходу аберацій хромосом в діапазоні малих доз гамма-опромінення [15].

На табл. 1-3 представлена база цитогенетичних даних для донорів з різною індивідуальною чутливістю до дії радіаційно-індукованого опромінення, визначеною за допомогою G_2 - radiosensitivity assay. По-перше, встановлено, що спонтанний рівень хромосомних аберацій у досліджених осіб не корелює з індивідуальною радіочутливістю. Так у обстежених осіб спонтанна частота хромосомних аберацій становить $2 \pm 1,54$; $1,5 \pm 1,54$; $18 \pm 2,61$, а індивідуальна радіочутливість 6,8; 20; 23 хроматидні делеції на 100 метафаз відповідно. У досліджуваного донора 3 спонтанна частота становить $18 \pm 2,61$; в спектрі пошкоджень основний відсоток становить частота хроматидних делецій - $15,1 \pm 1,62$. Відомо, що високий рівень спонтанної частоти аберацій хромосом за рахунок хроматидних делецій може вказувати на мутагенність навколишнього середовища де проживають обстежені особи, або ж на вплив хімічних мутагенів. Тому ми пов'язуємо підвищений рівень генетичних пошкоджень у донора 3 з додатковою мутагенною дією хімічних агентів.

Аналіз цитогенетичних даних за допомогою лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії показав, що для абераційних метафаз та загальної кількості аберацій хромосом в діапазоні малих доз у всіх випадках спостерігається плато, тобто дозозалежна ділянка. Наприклад у донора 2 кількість абераційних метафаз при дозі 0,1 Гр становить $14,0 \pm 2,66$ та при дозі 0,5 Гр відповідно - $14,1 \pm 2,66$; загальна кількість аберацій хромосом в дозі 0,1 Гр дорівнює $14,0 \pm 2,90$ та при дозі 0,5 Гр - $14,7 \pm 2,90$ (табл. 4-6).

У всіх обстежених донорів при тестуючому радіаційному навантаженні (in vitro) променеві маркери, а саме дицентричні

Таблиця 1
База цитогенетичних даних отриманих для донора 1

Цитогенетичний показник	Спонтанний рівень	Доза опромінення, Гр.			Стандартне відхилення	Стандартна похибка	Гр (число хроматидних делецій на 100 метафаз)
		0,1	0,5	1,0			
Абераційні метафази	2	4,5	9,3	15	4,362503	1,542378	6,8
Загальна кількість аберацій хромосом	2	4,5	9,3	15	4,516557	1,596844	
Парні фрагменти	0	0,5	1,7	1	1,371066	0,484745	
Точки та ацентричні кільця	1	0	1,2	1	1,849131	0,653767	
Аномальні моноцентрики	0	0	0,6	2	0,70862	0,250535	
Центричні кільця	0	0	0	0	0	0	
Дицентрики	0	0	0	3	2,232071	0,789156	
Хроматидні делеції	1	4	4,66	6	2,023616	0,715456	
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0	0	

Таблиця 2
База цитогенетичних даних отриманих для донора 2

Цитогенетичний показник	Сюжетний рівень	Доза опромінення, Гр.			Стандартне відхилення	Стандартна похибка	IP (число хроматидних делецій на 100 метафаз)
		0,1	0,5	1,0			
Аберантні метафазы	1,5	14	14,1	21	7,541398	2,666287	20
Загальна кількість аберацій хромосом	1,5	14	14,7	21	8,228685	2,909279	
Парні фрагменти	0,5	4,5	3,06	3	1,391813	0,49208	
Точки та ацентричні кільця	0	2	0	2	1,391813	0,49208	
Аномальні моноцентри	0	0	0,6	0	0,302076	0,1068	
Центричні кільця	0	0	0	1	0,372012	0,131526	
Дуцентри	0	0	1,2	5	1,66256	0,587804	
Хроматидні делеції	1	7,5	9,84	9	5,420426	1,91641	
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0	0	

Таблиця 3
База цитогенетичних даних отриманих для донора 3

Цитогенетичний показник	Сюжетний рівень	Доза опромінення, Гр.			Стандартне відхилення	Стандартна похибка	IP (число хроматидних делецій на 100 метафаз)
		0,1	0,5	1,0			
Аберантні метафазы	18	17	25,6	36	9,067809	2,617651	23
Загальна кількість аберацій хромосом	19	19,6	28,4	42	11,58277	3,343658	
Парні фрагменти	0	5,06	3,5	9	4,229931	1,221076	
Точки та ацентричні кільця	3,8	1,9	4,2	10	2,545882	0,734933	
Аномальні моноцентри	0	0	0,5	0	0,58225	0,168081	
Центричні кільця	0	0	0	0	0	0	
Дуцентри	0	0	1,4	9	3,121868	0,901206	
Хроматидні делеції	15,1	12,6	18	13	5,632993	1,626105	
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0,57735	0,166667	

Таблиця 4
Параметри лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії (донор 1)

Цитогенетичний показник	Помилка моделі			Лінійна регресія		Лінійно-квадратична регресія			Сплайнова регресія				
	лінійна	лінійно-квадратична	сплайнова	a	b	a	b	c	X ₀	a ₁	b ₁	a ₂	b ₂
Аберантні метафази	4,387	2,156	0,875	12,206	3,278	-6,329	18,723	2,486	0,300	19,532	2,198	21,73	5,166
Загальна кількість аберацій хромосом	4,387	2,156	0,875	12,206	3,278	-6,329	18,723	2,486	0,300	19,532	2,198	21,73	5,166
Парні фрагменти	1,607	0,629	0,622	0,794	0,622	-4,192	5,110	0,082	0,200	6,619	-0,054	6,565	-1,308
Точки та ацентричні кільця	21,431	17,495	12,726	0,183	1,503	-8,406	8,839	0,420	0,300	11,717	-0,198	11,519	4,871
Аномальні моноцентрики	0,284	0,041	0,001	2,122	-0,309	2,088	-0,028	-0,041	0,300	0,043	-0,003	0,04	0,839
Центричні кільця	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Дисцентрики	1,695	0,112	1,240	2,977	-0,542	5,331	-2,513	0,144	0,500	0,000	-0,000	-0,000	-3,000
Хроматидні делеції	5,572	5,433	3,548	3,998	2,144	-1,583	5,629	1,940	0,100	20,751	1,000	21,751	18,698
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 5
Параметри лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії (донор 2)

Цитогенетичний показник	Помилка моделі			Лінійна регресія		Лінійно-квадратична регресія			Сплайнова регресія				
	лінійна	лінійно-квадратична	сплайнова	a	b	a	b	c	X ₀	a ₁	b ₁	a ₂	b ₂
Аберантні метафази	69,868	59,652	8,731	13,992	7,786	13,602	28,000	6,035	0,100	106,055	1,500	107,555	11,226
Загальна кількість аберацій хромосом	69,337	56,689	7,186	14,130	7,838	15,069	29,647	5,898	0,100	106,953	1,500	108,458	11,306
Парні фрагменти	9,763	9,682	6,849	1,250	1,872	-1,208	2,494	1,717	0,100	21,350	0,500	21,85	1,623
Точки та ацентричні кільця	5,602	5,539	3,704	0,550	1,108	1,064	-0,546	1,245	0,100	16,772	0,000	16,772	-1,713
Аномальні моноцентрики	0,564	0,187	0,173	0,084	0,187	-2,600	2,761	-0,147	0,500	1,514	-0,073	1,441	1,513
Центричні кільця	0,370	0,254	0,199	0,878	-0,057	1,443	-0,608	0,129	0,500	-0,068	0,115	-1,082	-0,838
Дисцентрики	1,308	0,745	0,488	4,908	-0,301	3,180	1,634	0,108	0,500	2,838	0,076	2,914	-2,01
Хроматидні делеції	29,706	10,175	2,285	5,467	5,210	-18,725	24,750	2,799	0,100	67,123	1,000	68,123	-5,513
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 6
Параметри лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії (донор 3)

Цитогенетичний показник	Помилка моделі			Лінійна регресія		Лінійно-квадратична регресія			Сплайнова регресія				
	лінійна	лінійно-квадратична	сплайнова	a	b	a	b	c	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	b ₂
	X ₀												
Аберантні метафази	87,546	80,633	74,317	18,229	16,720	11,140	6,757	18,154	4,011	18,816	22,824	13,0554	
Загальна кількість аберантних хромосом	113,051	104,731	99,687	22,191	18,483	12,222	9,605	20,057	7,900	20,590	28,49	14,8	
Парні фрагменти	21,617	17,366	15,978	8,736	-1,385	1,673	1,882	12,537	-1,673	1,882	0,209	-1,879	
Точки та ацентричні кільця	6,695	2,800	2,771	6,908	2,232	8,362	-1,703	3,309	2,378	3,057	5,435	-1,508	
Аномальні моноцентрики	0,200	0,117	0,068	0,115	0,043	-1,222	1,373	-0,114	0,946	-0,108	0,838	0,946	
Центричні кільця	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Дисцентрики	6,495	1,494	0,532	8,908	-0,968	9,475	-0,849	0,252	3,324	0,049	3,373	-5,578	
Хроматидні делеції	98,060	89,760	80,762	-2,115	16,357	-12,206	10,455	14,785	4,432	15,156	19,597	8,5675	
Хроматидні обміни	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

хромосоми, зростають з дозою опромінення. Наприклад, у донора 1 в дозі 0,5 Гр частота дицентричних хромосом становить $1,4 \pm 0,90$; а при дозі 1,0 Гр $9,0 \pm 0,90$.

У табл. 4-6 представлені параметри, використаних для інтерпретації отриманих експериментальних даних, моделей регресії, а саме лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової.

Показано, що дозові залежності радіаційно-індукованих генетичних ефектів найточніше апроксимуються на основі моделі сплайнової регресії, похибка якої має найменше значення для всіх структурних перебудов обстежених донорів. Як бачимо з отриманих даних, у обстежених донорів найменша похибка моделі майже всіх цитогенетичних показників для сплайнової регресії. Наприклад, у донора 2 похибка для аберантних метафаз обчислена за допомогою лінійної регресії становить 69,868; лінійно-квадратичної -59,652; сплайнової -8,731; це означає що використання моделі сплайнової регресії в десятки разів підвищує точність інтерпретації характеру дозових кривих.

Окремий інтерес представляє оцінка виходу променевих маркерів (дицентричних хромосом) за дії малих доз. Наприклад, для донорів 2 і 3 вихід дицентриків найбільш коректно апроксимується за допомогою сплайнової моделі, похибка якої становить 0,488 та 0,532 відповідно. А для донора 1, вихід обмінних аберантних хромосом, найкраще апроксимується лінійно-квадратичною регресією з перевагою значення лінійного члену регресії - α . При цьому похибка моделі лінійної регресії становить 1,695; лінійно-квадратичної - 0,112; сплайнової - 1,240. Цей факт цікавий тим, що саме для цього донора визначена відносна радіо-резистентність організму (6,8/100 метафаз).

Висновки

1. Спонтанний рівень хромосомних аберантних хромосом не корелює з індивідуальною радіочутливістю обстежених осіб, визначеною за допомогою G2 - radiosensitivity assay.

2. Апроксимацію цитогенетичних ефектів за дії малих доз опромінення найкраще здійснювати за допомогою сплайнової регресії.

Література

1. Радиационная защита в медицинской рентгенологии /

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

Р.В.Ставицкий, Н.Н.Блинов, И.Х.Рабкин, Л.А.Лебедев. - М.: Кабур, 1994. - 270 с.

2. Сравнительное исследование структуры генных и хромосомных мутаций у работников ядерно химических предприятий / А. В.Севаньяев [и др.] // Радиационная биология. Радиозэкология. - 2005. - Т. 45, №2. - С. 149-161.

3. Sanberg A. A. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia / A. A. Sanberg // *Mutat. Res.* - 1991. - Vol. 247, № 2. - P. 231-240.

4. Цитогенетический анализ генотоксических эффектов у работников теплоэнергетического производства / Я.А.Савченко, В.Г.Дружинин, В.И.Минина [и др.] // Генетика. - 2008. - Т. 44, № 6. - С.857-862.

5. Дьоміна Е. А. Індивідуальна радіочутливість людини / Е.А.Дьоміна, М.О.Дружина, Н.М.Рябченко. - Київ : Логос, 2006. - 125 с.

6. Пикалова Л. В. Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиобиологии / Л.В.Пикалова // Молекулярная биология. - 2007. - № 9. - С. 160-168.

7. Барилляк І.Р. Біологічна індикація та дозиметрія за частотою нестабільних аберацій хромосом у лімфоцитах людини / І.Р.Барилляк, Е.А. Дьоміна // Цитология и генетика. - 2004. - № 4. - С. 72-85.

8. Дьоміна Е. А. Закономірності утворення аберацій хромосом в соматичних клітинах людини в залежності від дози опромінення / Е.А.Дьоміна, О.М. Ворощук // Вісник тов. генетиків і селекціонерів. - 2008. - Т. 6, № 1. - С. 166-174.

9. Мазурик В. К. Некоторые проблемы радиационной биохимии ДНК / В.К. Мазурик // Современные проблемы радиобиологии. Радиационная биохимия. Т. 4. : под ред. Е.Ф. Романцова. - М.: Атомиздат, 1975. - С. 5-59.

10. Altman K. J. Criteria for the evaluation and selection of radiation induced metabolic changes as biochemical indicator of radiation damage / K.J.Altman // Biochemical indicators of radiation injury in man: Proc. Sci. Meet / Paris - Le Vesinet. - IAEA / WHO / Vienna: IAEA, 1971. - P. 11- 32.

11. Севаньяев А. В. Радиочувствительность хромосом

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

лимфоцитов человека в митотическом цикле / А.В.Севаньяев. - М.: Энергоатомиздат, 1987. - 160 с.

12. Теория и практика построения калибровочных кривых в биодозиметрии / А.В.Рубанович, Г.П.Снигирева, В.А.-Шевченко [и др.] // Радиационная биология. Радиозэкология. - 2006. - Т. 46, № 4. - С. 447 - 456.

13. Цитогенетичний спосіб (G2assay) визначення індивідуальної радіочутливості людини з метою первинної профілактики радіогенного раку : метод. рекомендації / Е.А.Дьоміна, Н.М.Рябченко, М.О.Дружина, В.Ф.Чехун - Київ : Логос, 2007. - 28 с.

14. Ключин Д. А. Доказательная медицина: Применение статистических методов / Д. А.Ключин, Ю. И.Петунин. - М.: Диалектика, 2008. - 315 с.

15. Індукція генетичних пошкоджень за дії малих доз іонізуючої радіації / О. М.Демченко, Е. А.Дьоміна, Ю. І.Петунін, М. Ю.Савкіна // Пробл. екологічної та медичної генетики і клінічної імунології : збірник наук.праць. - Київ; Луганськ; Харків, 2009. - Вип. 1-2. - С. 52-63.

Резюме

Демченко О. М., Дьоміна Е. А., Савкіна М. Ю. База цитогенетичних даних для побудови калібрувальних кривих "малі дози-ефект".

В роботі представлена база цитогенетичних даних для побудови калібрувальних дозових кривих з урахуванням індивідуальної радіочутливості.

Ключові слова: біологічна дозиметрія, малі дози опромінення, радіочутливість.

Резюме

Демченко Е. Н, Демина Э. А., Савкина М. Ю. База цитогенетических данных для построения калибровочных "малые дозы-эффект".

В работе представлена база цитогенетических данных для построения калибровочных дозовых кривых с учетом индивидуальной радиочувствительность человека.

Ключевые слова: биологическая дозиметрия, малые дозы облучения, радиочувствительность.

Summary

Demchenko E.N., Dyomina E.A., Savkina M.Yu. The cytogenetic benchmarking database for the plotting of 'low-dose vs. effect' curves.

The cytogenetic database is presented which can be used for calibration dose curves plotting that take into account personal radiosensitivity.

Key words: biological dosimetry, low doses of ionizing radiation, radiosensitivity.

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П.Романюк

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики