

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНЫХ КРИВЫХ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ (ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ) ДОЗИМЕТРИИ

Э.А. Демина, Е.Н. Демченко, И.Р. Барияк

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (Киев)

*Научный центр радиационной медицины
АМН Украины (Киев)*

Введение

Подавляющее число исследований в области радиационной цитогенетики посвящено изучению зависимости "доза-эффект". Это обусловлено тем, что из многих количественных радиобиологических закономерностей наиболее существенна связь дозы облучения и величины индуцированного эффекта. Достижениями в области количественной радиационной цитогенетики современная наука прежде всего обязана Н.В. Лучнику и его последователю А.В. Севаньяеву [1-4].

Для биологической 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". Следует отметить, что 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 таковы 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 компонента 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, выполненных в области низких доз облучения, достаточно противоречивы: в одних случаях выход аберраций соответ-

ствуует 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 работы - исследовать характер калибровочных кривых по уровню радиационно-индуцированных аберраций хромосом в соматических клетках человека в интервале малых доз γ -излучения, а также в условиях действия радиопротектора.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования были лимфоциты периферичес-

кой крови 5 здоровых доноров; культивированные стандартным методом с некоторыми модификациями, описанными нами ранее [19]. Для оценки частоты и спектра хромосомных аберраций 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 аберраций 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

$$y = aD + b;$$

линейно-квадратичная модель

$$y = aD^2 + bD + c;$$

модель сплайновой регрессии

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

где y - количество аберраций хромосом на каждые 100 проанализированных метафаз; $a, b, c, a_1, a_2, b_1, b_2$ - коэффициенты (параметры) моделей.

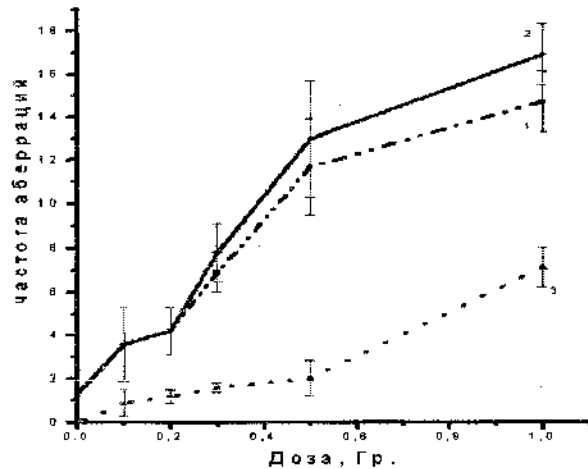
Вычисление параметров линейной и линейно-квадратичной моделей проводили стандартными методами расчета параметров в схеме линейной регрессии с помощью методов наименьших квадратов (МНК), а для вычисления параметров сплайнов использован разработанный статистический метод нелинейной регрессии, который базируется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

Полученные результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены усредненные цитогенетические данные, полученные при γ -облучении культур лимфоцитов (G_0 -

стадия митотического цикла) условно здоровых доноров в интервале доз 0,1-1,0 Гр.

Анализ полученных калибровочных кривых свидетельствует об их аномальном характере с наличием плато (дозонезависимого 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.



- 1-общая частота aberrантных метафаз
- 2- общая частота aberrаций хромосом
- 3-общая частота дицентрических хромосом

Рис. 1. Экспериментальные усредненные цитогенетические данные при γ -облучении культур лимфоцитов доноров в диапазоне доз 0,1-1,0 Гр.

Это может означать, что при построении калибровочных кривых целесообразно учитывать индивидуальную радиочувствительность конкретного донора, определяемую на основании G2-radiosensitivity assay [8]. В характере дозовых кривых в интервале изученных доз превалирует линейная компонента, что подтверждается значениями a и коэффициента регрессионных уравнений (рис.2).

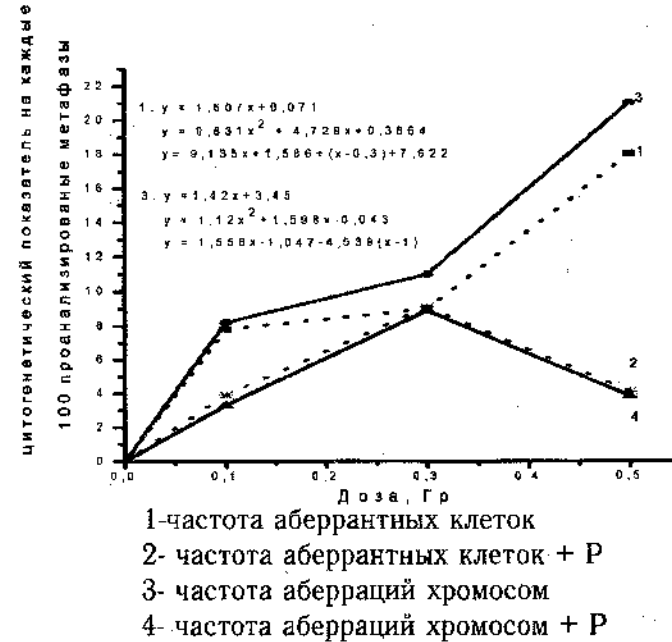


Рис.2. Индивидуальная дозовая кривая при дополнительном действии радиопротектора рибоксина.

При этом модель сплайновой регрессии (кусочно-линейные сплайны) существенно лучше линейной и линейно-квадратичной моделей описывает экспериментальные данные, полученные в исследуемом диапазоне доз. Улучшение качества аппроксимации достигается за счет уменьшения ошибки. Об этом свидетельствуют результаты сопоставления качества аппроксимации экспериментальных данных моделями разной сложности и их ошибок. Например, для цитогенетического показателя частоты aberrантных клеток ошибка линейной модели составила 4,5; линейно-квадратичной - 4,2; сплайновой - 3,0; для общей частоты aberrаций хромосом 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, 21-23 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 доз 0,1 и 0,5 Гр рибоксин, защищая клетки от радиационно-индуцированных повреждений, "доводит уровень aberrаций 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.

Ранее на экспериментальных животных было показано, что рибоксин - это эффективный радиопротектор при различных режимах радиационного воздействия [24]. Он является стимулятором метаболических процессов в организме как предшественник синтеза АТФ и нуклеотидов, поддерживает энергетический баланс в различных клетках и тканях и т.д. Защит-

ный эффект рибоксина на генетическом уровне наиболее радиочувствительных клеток организма человека - лимфоцитов крови - мы связываем с активацией ферментативных систем процессов репарации.

Выводы

1. С целью усовершенствования биологической дозиметрии на основании хромосомного теста для интерпретации характера дозовых кривых в области малых доз предпочтительнее использовать модель линейной сплайновой регрессии.

2. Радиопротектор инозин (рибоксин), снижая уровень радиационно-индуцированных aberrаций хромосом, изменяет аномальный характер кривой "доза-эффект".

Литература

1. Лучник Н.В. Об аномальной реакции при малых дозах облучения // *Биофизика*. - 1957. - Т. 2. - № 1. - С. 86-93.
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 пострадиационный период разными биологическими методами // *Радиационная биология. Радиозкология*. - 2004. - Т. 44, № 6. - С. 637-652.
4. Севаньяев А.В., Насонов А.П. Калибровочные дозовые кривые хромосомных aberrаций 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 // *Променева диагностика, променева терапія: зб. наук. робіт*. - 2001. - Вип. 11. - С. 23-30.
6. Барилляк И.Р., Демина Э.А., Ключин Д.А. и др. О форме дозовых кривых радиационно-индуцированных цитогенетических повреждений лимфоцитов человека // *Цитоло-*

гия и генетика. - 2001. - Вып. 35, № 4. - С. 55-58.

7. Нестеров Е.Б., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераськин 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. - Київ: 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-Ruling 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. I. 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 // Механизмы действия сверхмалых доз: Матер. III международного симпозиума. - 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 тяжёлыми ионами, протонами и гамма-излучением ^{60}Co в низких дозах in vitro: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2007. - 20 с.

18. Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al. Chromosomal aberration 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. - Київ, 2007. - 28 с.

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

21. Эйбус Л.Х. О форме дозовой кривой цитогенетических повреждений ГНВ при облучении в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1999. - Т. 39, № 5-С. 12-15.

22. 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.

23. 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.

24. Вернигоров Л.А., Чертков К.С., Крылов К.П. Химия, фармакология и механизм действия противолучевых средств. М., 1990. - С. 16-17.

Демина Э.А., Демченко Е.Н., Барияк И.Р. Построение калибровочных кривых в биологической (цитогенетической) дозиметрии.

Показано, что с целью усовершенствования биологической дозиметрии на основании хромосомного теста для интерпретации характера дозовых кривых в области малых доз облучения предпочтительнее использовать модель линейной сплайновой регрессии. Радиопротектор инозин (рибоксин), снижая уровень радиационно-индуцированных аберраций хромосом, "снимает" плато, изменяя аномальный характер кривой "доза-эффект" в области действия малых доз ионизирующего излучения.

Ключевые слова: биологическая дозиметрия, малые дозы облучения, модель сплайновой регрессии, аберрации хромосом, радиопротектор, инозин.

Резюме

Дьоміна Е. А., Демченко О. М., Барияк І. Р. Побудова калібрувальних кривих в біологічній (цитогенетичній) дозиметрії.

В даній роботі показано, що з метою вдосконалення біологічної дозиметрії на основі хромосомного тесту для інтерпретації характеру дозових кривих в області малих доз опромінення більш доцільно використовувати модель лінійної сплайнової регресії. Радіопротектор инозин (рибоксин) знижує рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом, "знімає" плато, змінюючи аномальний характер кривої "доза-ефект" в області дії малих доз іонізуючого випромінювання.

Ключові слова: біологічна дозиметрія, малі дози опромінення, модель сплайнової регресії, аберації хромосом, радіопротектор, инозин.

Summary

Dyomina E.A., Demchenko E.N., Barilyak I. R. Calibration curves plotting in biological (cytogenetic) dosimetry.

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 (ribosin) 'abrogates' the plateau altering the abnormal character of 'dose-effect' curve that is specific for the region of low dose ionizing irradiation.

Key words: biological dosimetry, low doses of ionizing radiation, spline regression models, chromosome aberrations, radioprotector, inosin.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАКА

Э.А. Демина, И.Р. Барияк

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины (Киев)

Научный центр радиационной медицины АМН Украины (Киев)

В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов канцерогенеза, в том числе радиационного. Накоплен большой фактический массив данных, свидетельствующий об определяющей роли изменений генетического материала клеток в развитии рака.

Рак - генетически детерминированное заболевание, возникающее вследствие нарушения нормальной регуляции роста клеток под влиянием разнообразных мутаций. Большинство опухолей индуцируется исключительно мутациями в соматических клетках, но некоторые виды рака могут быть обусловлены наследственными мутациями, то есть мутациями, передающимися половыми клетками от поколения к поколению [1]. Наследственные опухоли, детерминируемые одним геном, составляют всего 5,0-7,0%, а основная часть - это мультифакторные опухоли, развивающиеся под влиянием генетических и внешнесредовых факторов. Развитие опухоли начинается с иницирующей мутации, нарушающей механизмы регуляции размножения клетки. В зависимости от типа клетки иницирующая мутация может экспрессироваться сразу или после латентного периода. В последнем случае для экспрессии начальной онкогенной мутации должно произойти стимулирование или промотирование - получение митогенного сигнала, причиной которого могут быть гибель прилежащих клеток либо воздействие агентов, способных ускорить рост клеток. Стадия прогрессии - приобретение инвазивности, то есть способности опухолевых клеток вращать в окружающую нормальную ткань, нарушая ее функции. Приобретение инвазив-