

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ РАДИОЛОГИИ И АГРОЭКОЛОГИИ**

19-2000-250

На правах рукописи
УДК 577.346: 577.217

РЕПИН
Михаил Васильевич

**СТАБИЛЬНЫЕ И НЕСТАБИЛЬНЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ
АБЕРРАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА,
ИНДУЦИРУЕМЫЕ ИЗЛУЧЕНИЯМИ С РАЗНЫМИ ЛПЭ**

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск 2000

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований Объединенного института ядерных исследований.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор **Е.А. Красавин**

кандидат биологических наук **Р.Д. Говорун.**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **А.В. Севанькаев**

доктор биологических наук **С.А. Гераськин.**

Ведущая организация: Институт общей генетики, г. Москва.

Защита диссертации состоится 13 декабря 2000 г. в 13 ч 00 мин. на заседании Диссертационного совета по радиобиологии Д 120.81.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу: 249020, Калужская обл., г. Обнинск, ВНИИСХРАЭ, Диссертационный совет Д 120.81.01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 249020, Калужская обл., г. Обнинск, ВНИИСХРАЭ, Диссертационный совет Д 120.81.01.

Автореферат разослан “ ____ ” ноября 2000 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Санжарова Н.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Проблема биологического действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками является весьма актуальной в радиобиологии. Это обусловлено необходимостью решения многих задач: радиозкологических проблем; вопросов нормирования лучевых нагрузок у лиц, работающих в смешанных полях ионизирующих излучений; проблем радиационной безопасности космических полетов человека; использования источников ионизирующих излучений для лучевой терапии онкозаболеваний и др.

Наименее изученным является мутагенное действие плотноионизирующих излучений, прежде всего, на клетки высших эукариот, в том числе человека. Практически не изучены закономерности образования стабильных хромосомных мутаций при действии ионизирующих излучений разного качества. Исследование этих закономерностей представляется весьма важным, поскольку стабильные aberrации способны длительно сохраняться в популяциях облученных клеток. С ними связано, по общепризнанному мнению, развитие мутагенных процессов в организме и канцерогенез.

Количественный учет стабильных хромосомных aberrаций может также рассматриваться как один из надежных способов для разработки и применения методов биодозиметрии, особенно в отдаленные сроки после лучевого воздействия. Классические цитогенетические методы, применяемые в биодозиметрии, основаны на учете нестабильных хромосомных aberrаций (дигентрики и кольца). Возможность оценки поглощенной дозы при этом ограничивается острым периодом после лучевого воздействия. Большим достижением явилась разработка техники флуоресцентной гибридизации *in situ* — FISH-метода. Он позволяет выявлять стабильные aberrации хромосом (транслокации) в клетках. В настоящее время во многих научных лабораториях с использованием FISH-метода ведутся исследования образования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в клетках человека при действии рентгеновских и γ -лучей. Только в последние годы начали появляться единичные работы по исследованию стабильных хромосомных aberrаций, возникающих в клетках человека при действии плотноионизирующих излучений.

Реализация программы длительных космических полетов человека также поставила задачу детального изучения биологического действия протонов релятивистских энергий, составляющих основную часть спектра космических

излучений.

Учитывая актуальность, научную и практическую значимость изучения генетического действия ионизирующих излучений разного качества, а также неполноту сведений в этой области, мы провели исследование закономерностей формирования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах человека при действии разных видов ионизирующих излучений широкого диапазона линейной передачи энергии (ЛПЭ).

Цель и основные задачи исследования. Целью исследования явилось сравнительное изучение количественных и качественных закономерностей образования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека с использованием FISH-техники и стандартного метафазного метода анализа при действии ионизирующих излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне: γ -лучей, ускоренных протонов с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ $\sim 0,218$ кэВ/мкм) и ионов азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить дозовые зависимости частоты образования стабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека, детектируемых FISH-методом, при γ -облучении и действии ускоренных протонов и ионов азота ^{14}N ,
- изучить дозовые зависимости частоты образования разных видов нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека, детектируемых стандартным метафазным и FISH-методами, при действии γ -лучей, протонов и ионов азота ^{14}N ,
- провести сравнительный анализ выявленных закономерностей индукции стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах человека при действии исследованных видов ионизирующих излучений,
- провести оценку ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ускоренных ионов азота ^{14}N по цитогенетическим показателям,
- оценить возможность использования теста “стабильных aberrаций хромосом” для целей биологической дозиметрии.

Научная новизна. В работе впервые:

- исследованы FISH-методом закономерности образования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом-1 и -2 при облучении лимфоцитов крови человека разными дозами ускоренных протонов с энергией 1 ГэВ,
- исследованы FISH-методом закономерности образования стабильных и

нестабильных aberrаций хромосом-1 и -2 при облучении лимфоцитов крови человека разными дозами ускоренных ионов азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~77 кэВ/мкм),

— исследованы стандартным метафазным методом нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека при облучении разными дозами протонов с энергией 1 ГэВ,

— исследованы стандартным метафазным методом нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека при облучении разными дозами ускоренных ионов азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон,

— предложена модифицированная методика для пересчета уровней aberrаций отдельных хромосом, детектируемых FISH-методом, на геномные частоты хромосомных aberrаций, применимая для случаев использования нескольких флуорохромов одновременно и для разных геномов. Она была применена для расчета геномных частот aberrаций в лимфоцитах крови человека, облученных ускоренными ионами азота ^{14}N и протонами с энергией 1 ГэВ, на основе данных FISH-анализа aberrаций хромосом-1 и -2.

Научно-практическая значимость работы. Исследования стабильных хромосомных aberrаций после воздействия ионизирующих излучений разного качества имеют фундаментальное значение для установления количественных и качественных закономерностей их формирования в клетках человека. Результаты работы могут быть использованы для радиобиологического обоснования применения разных видов ионизирующих излучений в лучевой терапии новообразований, для научного обоснования предельно допустимых уровней облучения человека при воздействии ионизирующих излучений с разными значениями ЛПЭ, при разработке и применении методов непосредственной и ретроспективной биодозиметрии.

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 9 работ. Основные результаты доложены на Межд. симп. “Radiation Biology and its Application in Space Research. Mutation Induction by Ionizing Radiation” (Brno, ČR, 1994); Раб. совещ. “Современные проблемы радиобиологии” (Дубна, 1996); Межд. симп. “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии” (Москва–Дубна, 1997); Межд. раб. совещ.: NATO-Advanced Research Workshop “Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation” (Brno, ČR, 1997); Межд. раб. совещ. “10th Annual Space Radiation Health Investigators’ workshop” (Upton, N.-Y., USA, 1999); на семинарах Отде-

ления радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ, Дубна.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 106 страницах, состоит из введения, 4 глав и выводов, содержит 8 таблиц и 19 рис. Список литературы включает 147 названий на русском и английском языках.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы лимфоциты человека, выделенные из свежевзятой крови здоровых доноров (23–40 лет, ♀ и ♂). Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов для цитогенетического анализа проводили по общепринятой методике.

γ-облучение лимфоцитов проводили в стеклянных флаконах (по 3 мл плазмы крови): для последующего FISH-анализа — γ-лучами ^{137}Cs в дозах 1–7 Гр (мощность дозы 3,6 Гр/мин), для анализа стандартным метафазным методом — γ-лучами ^{60}Co в дозах 0,5–5 Гр (мощность дозы ~0,7 Гр/мин). Облучение лимфоцитов ионами азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~77 кэВ/мкм) проводили на ускорителе тяжелых ионов У-400М ОИЯИ в дозах 0,5–3 Гр (мощность дозы – 6 Гр/мин) с помощью физико-дозиметрической установки “Геном” (Череватенко А.П., 1986, 1989), обеспечивавшей формирование пучка, определение ЛПЭ частиц и дозы облучения в биообъекте, автоматическую смену образцов. Облучение лимфоцитов протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ ~0,218 кэВ/мкм) проводили в эппендорфовских пробирках на синхрофазотроне ОИЯИ в дозах 0,15–3,6 Гр. Поток протонов при поглощенной дозе в 1,0 Гр составил $2,71 \cdot 10^9$ частиц/см² (Timoschenko G.N. *et al.*, 1999).

Препараты для анализа стандартным метафазным методом подвергали гидролизу 5N HCl (10 мин при ~20°C), окрашивали 15 мин 3% раствором Гимза на фосфатном буфере (рН 6,8). Для учета хромосомных aberrаций использовали световые микроскопы. Для гибридизации *in situ* хромосомы-1 использовали биотинилированные пробы ДНК (“Cambio”, UK), для хромосомы-2 — дигоксигенированные пробы ДНК (“Oncor”, UK), для выявления центромер — флуоресцеиновые пан-центромерные пробы ДНК (“Cambio”, UK). Процедуры проводили согласно инструкциям фирм. Для FISH-анализа лимфоцитов использовали компьютеризированные флуоресцентные микроскопы (“Zeiss”, “Leica”, Germany; “Hamamatsu”, Japan). Хромосомные aberrации классифицировали в соответствии с общепринятой номенклатурой и модифицированным вариантом PAINT-системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитогенетический анализ лимфоцитов крови человека свидетельствует о выраженном повреждающем воздействии γ -лучей, ускоренных протонов и ионов азота на хромосомный аппарат клеток.

Клетки с хромосомными aberrациями

Данные по частотам клеток с хромосомными aberrациями, детектируемыми в облученных лимфоцитах стандартным метафазным методом в геноме в целом или FISH-методом в хромосомах-1 и -2, приведены на рис. 1 и 2. Они свидетельствуют о высокой частоте повреждений хромосом-1 и -2. Вместе с тем, по уровням клеток с aberrациями хромосомы-1 или -2 существенных отличий не отмечено.

При воздействии протонами и γ -лучами наблюдается линейный характер дозовой зависимости частоты образования клеток с хромосомными aberrациями при анализе обоими методами. Не отмечено существенных различий по данному показателю при действии γ -излучения и протонов высоких энергий. Частота aberrантных клеток после облучения ионами азота свидетельствует об их высокой эффективности. Частоты клеток с aberrациями хромосомы-1 и хромосомы-2 резко увеличиваются уже при дозах 0,5–0,75 Гр, достигая 45%

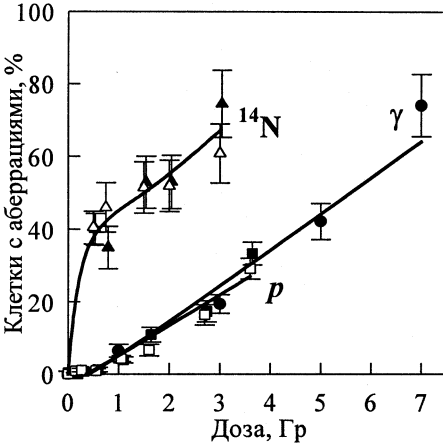


Рис. 1. Дозовые зависимости частоты клеток с aberrациями хромосом-1 (темные значки) и -2 (светлые значки) после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (\bullet), протонами (\blacksquare) и ионами азота ^{14}N (\blacktriangle) (FISH-метод)

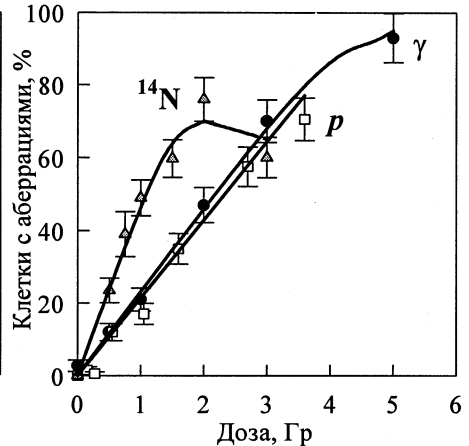


Рис. 2. Дозовые зависимости частоты клеток с хромосомными aberrациями после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (\bullet) протонами (\square) и ионами азота ^{14}N (\triangle) (стандартный метафазный метод)

(рис. 1). В последующем при увеличении доз до 3 Гр эффекты линейно возрастают до уровня ~65%. При анализе стандартным метафазным методом зависимость частоты образования клеток с абберациями от дозы облучения ионами азота имеет линейный характер на начальном участке кривой, но при дозах >2 Гр наблюдается отклонение от линейности со снижением уровня эффекта.

При действии редкоизионизирующих излучений в диапазоне исследованных доз в клетках наблюдалось повреждение только одной из двух гомологичных хромосом. При действии ионов ^{14}N число клеток с обоими поврежденными гомологами существенно повышалось. Среди проанализированных клеток после облучения дозами 0,5–1,5 Гр обнаружено 4–7% клеток с обоими поврежденными хромосомами-1 и 7–11% клеток с поврежденными хромосомами-2. С увеличением дозы до 3 Гр их число возрастало до 20–30%. Кроме того, в 0,8% проанализированных клеток были выявлены дицентрики из гомологичных хромосом-1. Доля клеток с обоими поврежденными гомологами от общего числа абберантных клеток составила 12–14% для хромосом-1 и 17–20% для хромосом-2, достигая 30–40% при дозе 3 Гр, то есть суммарно число клеток с абберациями обоих гомологов этих хромосом увеличивалось от почти 30% до 60% и более при увеличении дозы ионов азота от 0,5 до 3 Гр.

Общее число хромосомных аббераций

Данные по общему числу хромосомных аббераций, детектированных в лимфоцитах крови человека FISH- и стандартным метафазным методами, приведены на рис. 3 и 4. Видно, что при действии протонов и γ -лучей зависимость эффекта от дозы облучения описывается линейно-квадратичной функцией. Выявлена высокая эффективность ионов азота, при этом зависимость эффекта от дозы облучения приближается к линейной.

Кривые зависимости общего числа аббераций от дозы облучения протонами по уровням эффекта существенно не отличаются от γ -излучения как при FISH-анализе отдельных хромосом-1 и -2, так и при стандартном метафазном исследовании генома в целом. После облучения лимфоцитов ускоренными ионами азота ^{14}N наблюдаются высокие уровни повреждения хромосом-1 и -2. Частоты их аббераций резко увеличиваются уже при воздействии в дозах 0,5–0,75 Гр. При метафазном анализе повреждений хромосом генома в целом выявлено снижение эффекта при наиболее высокой дозе облучения (3 Гр). Нами

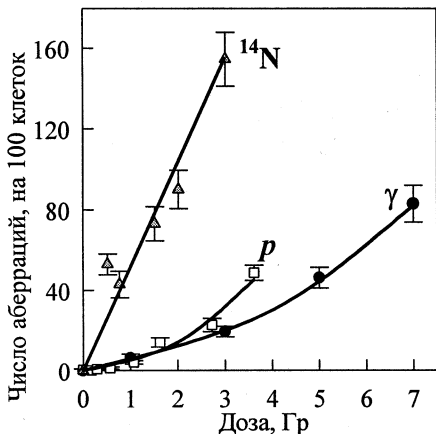


Рис. 3. Дозовая зависимость общего числа aberrаций хромосомы-1 в лимфоцитах крови человека после облучения γ -лучами (●), протонами (□) и ионами азота (Δ) (FISH-метод)

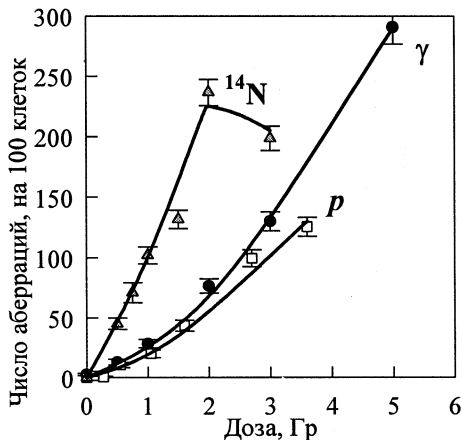


Рис. 4. Дозовая зависимость общего числа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека после облучения γ -лучами (●), протонами (□) и ионами азота (Δ) (стандартный метафазный метод)

не отмечено существенных различий по уровню aberrаций, возникающих в хромосомах-1 и -2, после облучения как протонами, так и ионами азота.

Стабильные aberrации хромосом: транслокации и инсерции

Основную часть стабильных aberrаций хромосом-1 и -2 в лимфоцитах крови человека, облученных исследованными видами излучений, составили транслокации. Были найдены лишь единичные инсерции в хромосомах-1 и -2 и только после облучения ионами ^{14}N в дозе 3 Гр их частота оказалась повышенной до 13 на 100 проанализированных клеток. Не отмечалось существенных различий по уровню транслокаций, индуцируемых в хромосомах-1 и -2. После γ -облучения транслокации составляли до 45% от общего числа aberrаций, выявляемых в хромосомах-1 FISH-методом. Близко к такому уровню их количество и после облучения протонами. Но их доля от общего числа aberrаций, индуцированных ионами азота, оказалась равной ~25%.

При действии γ -лучей и протонов наблюдается линейно-квадратичная зависимость частоты транслокаций от дозы облучения (рис. 5). При этом не отмечено существенных количественных отличий при их воздействии. Наиболее высокий уровень транслокаций хромосом-1 и -2 выявлен при действии ионов азота, причем зависимость эффекта от дозы описывалась линейной функцией.

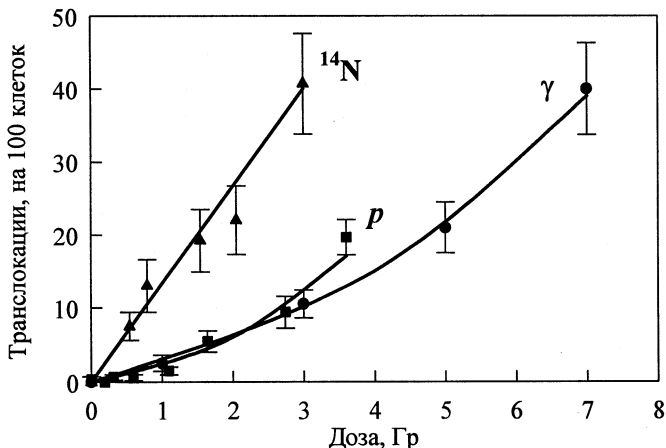


Рис. 5. Дозовые зависимости частоты транслокаций хромосомы-1 после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (●), протонами с энергией 1 ГэВ (■) и ионами азота ^{14}N (▲)

Нестабильные хромосомные aberrации

Полученные данные по частоте образования нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека после воздействия исследованными видами излучений свидетельствуют о том, что наибольшее число хромосомных aberrаций, выявляемых при анализе стандартным метафазным методом, составляют дицентрики (до ~40% от общего числа). Кроме того, отмечена высокая частота образования интерстициальных делеций, сопоставимая с выходом фрагментов. Для фрагментов характерна линейная зависимость эффекта от дозы для всех видов излучений. Дозовые зависимости частоты образования дицентриков и интерстициальных делеций при действии протонов и γ -лучей описываются линейно-квадратичной функцией, а при действии ионов азота она близка к линейной. По сравнению с воздействием γ -лучей и протонов с энергией 1 ГэВ облучение лимфоцитов ионами азота ^{14}N сопровождалось увеличением образования и дицентриков и интерстициальных делеций.

При анализе FISH-методом также были выявлены разные виды нестабильных aberrаций хромосом-1 и -2 лимфоцитов человека. Ионы азота индуцировали наибольшее число разных видов таких aberrаций: при действии даже в невысоких дозах наблюдалось значительное повышение частоты их образования по сравнению с воздействием редкоионизирующими излучениями. Вместе с тем, обращает внимание весьма низкий уровень выявляемых колец. Частота

образования дицентриков повышалась с увеличением дозы облучения до максимума в 10–13% при наибольших исследованных дозах всех видов излучений. При этом в случае облучения протонами и γ -лучами частота образования дицентриков характеризовалась линейно-квадратичной зависимостью от дозы. Уровень дицентриков, образующихся с участием хромосомы-1, оказался более высоким в случае облучения протонами по сравнению с γ -лучами.

После облучения ионами азота при FISH-анализе отмечены высокие частоты образования фрагментов хромосом-1 и -2 — до 50% всех выявленных аберраций. Уже при воздействии наименьших доз (0,5–0,75 Гр) фрагментоз хромосом-1 и -2 оказался резко повышенным. Для всех видов излучений характерна линейная зависимость частоты фрагментов от дозы облучения. По данному показателю не выявлено существенных количественных отличий при воздействии протонами и γ -лучами.

ОБЭ протонов и ионов азота ^{14}N

В таблице сведены данные по ОБЭ ускоренных протонов и ионов азота ^{14}N по сравнению с γ -излучением. Коэффициенты ОБЭ определены по разным ци-

Таблица. Коэффициенты ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ионов азота (оценка по разным цитогенетическим тестам)

| Тест | Протоны, 1 ГэВ | | Ионы азота ^{14}N | |
|--------------------------------|----------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | FISH-метод | Стандартный метафазный метод | FISH-метод | Стандартный метафазный метод |
| Клетки с аберрациями хромосом | 0,9 | 1,0 | 3,4 | 2,0 |
| Общее число аберраций хромосом | 1,4 | 0,9 | 6,0 | 2,6 |
| Транслокации | 1,1 | — | 3,1 | — |
| Дицентрики | 1,7 | 0,9 | 5,2 | 2,3 |
| Интерстициальные делеции | — | 1,0 | — | 2,5 |
| Фрагменты | 0,7 | 1,0 | 5,7 | 2,0 |

тогенетическим показателям. Приведенные данные свидетельствуют о том, что по большинству тестов протоны с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ ~0,218 кэВ/мкм) по своей эффективности сходны с γ -излучением. Коэффициенты ОБЭ протонов близки к единице — 0,9–1,1. Единичные показатели несколько превышали эти величины, что, вероятно, определяется некоторыми методическими особенностями. В несколько раз более эффективными являются ионы азота с ЛПЭ ~77 кэВ/мкм. При этом более высокие значения коэффициентов ОБЭ были получены по данным FISH-анализа. Если при метафазном анализе нестабильных хромосомных aberrаций в геноме в целом коэффициенты ОБЭ ионов азота, оценка которых проведена по разным тестам, находились в пределах 2,0–2,6, то по данным FISH-анализа хромосом-1 и -2 они оказались более высокими и составили от 3,1 до 6,0.

Математические подходы для сопоставления частот хромосомных aberrаций, выявляемых FISH- и стандартным метафазным методами

В нашем исследовании были выведены формулы, позволяющие рассчитать геномные частоты образования транслокаций F_T , дигентриков F_D и фрагментов F_A путем пересчета на полный геном их частот F_t , F_d и F_a , детектируемых при окрашивании “ n ” хромосом в разные цвета:

$$F_T = F_t \cdot \frac{1 - \sum_{i=1}^N C_i^2}{2 \sum_{i=1}^n C_i - \sum_{i=1}^n C_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n C_i \right)^2},$$

$$F_D = F_d \cdot \frac{1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N C_i^2}{2 \sum_{i=1}^n C_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n C_i \right)^2},$$

$$F_A = F_a \left/ \sum_{i=1}^n C_i \right.,$$

где C_i — доля i -ой хромосомы в геноме, N — общее число хромосом в геноме. По этим формулам был проведен пересчет на полный геном частот aberr-

раций хромосом-1 и -2, исходя из их доли в геноме ($C_1 = 0,082$ и $C_2 = 0,08$).

Сравнение геномных частот образования дицентриков, определенных стандартным метафазным и FISH-методами, показывает аналогичный характер их зависимостей от дозы облучения при воздействии соответствующими видами ионизирующих излучений. Однако при облучении лимфоцитов человека разными дозами γ -лучей отмечено превышение в 2,5–5 раз частоты образования дицентриков, определенных стандартным метафазным методом, над частотой образования дицентриков, пересчитанных на полный геном по данным, полученным для хромосом-1 и -2.

При сравнении частот образования транслокаций хромосом-1 и -2, пересчитанных на полный геном, и частот образования дицентриков, определенных стандартным метафазным методом, выявлен аналогичный характер их дозовых зависимостей при воздействии соответствующими исследованными видами излучений. Однако показано превышение геномных частот образования транслокаций над уровнем дицентриков.

Что касается фрагментов, то полученные данные свидетельствует о превышении пересчитанных на полный геном частот образования фрагментов, детектированных FISH-методом в хромосомах-1 и -2, над их частотами, выявленными стандартным метафазным методом: после γ -облучения в исследованных дозах в 3,9–6,3 раза, после воздействия протонами в 2,2–4,8 раза и ионами азота в 21–25.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании проанализирована частота разных видов aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека после их облучения γ -лучами, ускоренными протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ ~0,218 кэВ/мкм) и ионами азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~77 кэВ/мкм) с использованием FISH-техники и стандартного метафазного метода исследования. FISH-методом были выявлены стабильные aberrации хромосом-1 и -2, основную часть которых составили транслокации.

Частота образования транслокаций, выявленных при воздействии разных доз γ -облучения, в 3–5 раз превышала частоту образования дицентриков, детектированных FISH-методом в хромосоме-1. Полученные результаты находятся в соответствии с ранними данными Lucas J.N. *et al.* (1989), отмечавшими при разных дозах γ -лучей такие превышения в 1,2–9 раз, Cremer T. *et al.* (1990)

— в 1–12 раз и Natarajan A.T. *et al.* (1992) — в 1,5–9 раз. Однако авторы предполагают, что это обстоятельство связано, вероятнее всего, с затрудненным выявлением центромер (и соответственно дицентриков) при анализе “окрашенных” хромосом, что могло привести к сдвигам в соотношении между этими абберациями в случае, если дицентрик оценивался как простая транслокация (нереципрокная). При облучении лимфоцитов протонами, которые являются редкоизионизирующим излучением и по своей эффективности аналогичны воздействию γ -лучей, FISH-анализ хромосом был проведен нами с дополнительным окрашиванием их центромерных регионов флуоресцентным красителем при использовании пан-центромерных проб. Величины соотношений между транслокациями и дицентриками для хромосомы-1 после облучения в дозах свыше 1 Гр хотя и оказываются сниженными по сравнению с γ -излучением, тем не менее, выход транслокаций оставался примерно в 1,4 раза более высоким, чем дицентриков. Причем, при облучении в дозах менее 1 Гр были обнаружены только транслокации. Что касается воздействия ускоренными ионами азота ^{14}N (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм), то, как и при γ -облучении, соотношение между транслокациями и дицентриками составило в среднем около 3,5. Превышение уровня транслокаций над дицентриками было отмечено также Füssel K. *et al.* (1997) при FISH-анализе хромосом-4 и -8 в фибробластах человека, облученных ионами ^{12}C (ЛПЭ $\sim 16,2$ кэВ/мкм) и рентгеновскими лучами: в 1,7 и в 2,4 раза соответственно.

Сопоставление полученных нами данных показало, что при воздействии всеми исследованными видами ионизирующих излучений в дозах более 1 Гр пересчитанные на полный геном частоты транслокаций, детектированных FISH-методом в хромосомах-1 и -2, примерно в 2 раза выше, чем частоты дицентриков, выявленных в лимфоцитах стандартным метафазным методом.

Как видно на рис. 5, частоты образования транслокаций увеличиваются с дозой при воздействии как γ -лучами, так и ионами азота в диапазоне исследованных доз. Что касается дицентриков, то в случае облучения клеток ионами азота их частоты достигают максимума (соответствующего примерно одному дицентрику на клетку), который наблюдается при дозе 1,5 Гр при анализе FISH-методом или 2 Гр при анализе стандартным метафазным методом, и затем снижаются. Тенденция к снижению их частот отмечается также при анализе стандартным метафазным методом γ -облученных лимфоцитов в высоких дозах (5 Гр). Такое снижение, очевидно, определяется выраженной задержкой

деления или более поздним вступлением в митоз клеток, содержащих более одного дицентрика. Отражением этого может служить также наблюдаемое отклонение от линейности дозовой зависимости частот клеток с хромосомными aberrациями (со снижением их уровня) при аналогичных величинах доз облучения ионами азота или γ -лучами (рис. 2).

Наблюдаемые различия в геномных частотах образования фрагментов, детектируемых разными методами, возможно, определяются методическими особенностями FISH-анализа метафазных клеток. При этом затруднена идентификация таких aberrаций хромосом как интерстициальные и хроматидные делеции и их дифференцировка от свободных фрагментов хромосом. Однако если сравнивать пересчитанные на весь геном частоты фрагментов хромосом-1 и -2, выявленных FISH-методом, с суммой частот интерстициальных делеций, хромосомных и хроматидных фрагментов, детектированных стандартным метафазным методом в геноме, то они остаются повышенными в среднем в 1,2–1,4 раза в случаях облучения γ -лучами и протонами и в 8 раз при облучении ионами азота ^{14}N .

Результаты такого рассмотрения подтверждают предположение о более высокой вероятности повреждения хромосом-1 и -2 по сравнению с другими хромосомами генома при воздействии ионизирующими излучениями, особенно плотноионизирующих. Что касается последних, то в имеющихся единичных работах (Griffin C.S. *et al.*, 1995) также был отмечен высокий уровень фрагментов, не связанных с обменами, при изучении FISH-методом хромосомных aberrаций в фибробластоидных клетках человека после облучения α -частицами.

К настоящему времени накапливаются данные, которые указывают на разную радиочувствительность отдельных хромосом в геноме человека при воздействии редкоионизирующих излучений. Причем она не может быть объяснена только на основе предположения о пропорциональности радиочувствительности хромосом их длине. Так, конденсированный хроматин в эмбриональных фибробластах китайского хомячка оказывается более резистентным к радиационно-индуцированным повреждениям по сравнению с неконденсированным хроматином (Natarajan A.T. *et al.*, 1994). Ранее это было отмечено для лимфоцитов человека (Vyas R.X. *et al.*, 1991). Выявлено различие в кинетике репарации хромосом: процессы репарации проходят более быстро в эухроматине, чем в гетерохроматине (Sliepcevic P. and Natarajan A.T., 1994). В нашем исследова-

нии (Lukášová E. *et al.*, 1997; 1999) также наблюдалась высокая индукция аберраций в хромосоме-1 по сравнению с Y-хромосомой при облучении лимфоцитов нейтронами ($E \approx 7$ МэВ) и γ -лучами. Принимая во внимание эти результаты, можно предположить, что наблюдаемая в наших экспериментах высокая частота аберраций в хромосомах-1 и -2 по сравнению с остальным геномом может определяться эухроматиновой структурой этих хромосом. Кроме того, полученные в последнее время данные с применением FISH-техники “окрашивания” отдельных хромосом непосредственно в интерфазных ядрах клеток показывают, что хромосомы в них специфически плотно упакованы и занимают строго ограниченную территорию в клеточном ядре (Cremer C. *et al.*, 1996). Отсюда следует предположение, что вероятность образования аберраций между хромосомами, граничащими в ядре клетки друг с другом, будет выше, чем между хромосомами, имеющими те же физические длины, но пространственно разделенными друг от друга.

Таким образом, на данный момент ясно, что различие в радиочувствительности отдельных хромосом не может быть объяснено только на основе их физической длины. Эти обстоятельства наряду с другими, связанными с особенностями используемых методов, могли сказаться и на различиях в коэффициентах ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ионов азота ^{14}N , рассчитанных нами по разным цитогенетическим показателям при анализе стандартным метафазным и FISH-методами (табл.).

Для суждения об уровне симметричных обменных аберраций во всем геноме может быть полезным установление соотношения между фракцией транслокаций и фракцией дицентриков и колец, выявляемых в хромосомах-1 и -2 FISH-методом. Так, по полученным нами данным, не отмечено существенных количественных отличий между ними при FISH-анализе обеих хромосом в лимфоцитах, облученных протонами или ионами азота в дозах >1 Гр. Доли этих видов аберраций составили при облучении протонами около 35 %, а ионами азота — около 25 %. Мы можем предположить, что такие соотношения между фракциями симметричных и несимметричных обменов сохранятся и во всем геноме. Было суммировано количество транслокаций, пересчитанных на весь геном, исходя из их уровней в хромосомах-1 и -2, с общим числом аберраций, детектированных стандартным метафазным методом во всем геноме, и рассчитаны доли транслокаций и доли дицентриков и колец от такого суммарного числа хромосомных аберраций. Действительно, при воздействии редкои-

онизирующими излучениями (γ -лучами, протоны с энергией 1 ГэВ) доли этих видов aberrаций от их общего числа составили около 30–35 %. При воздействии ионами азота доля дицентриков и колец также имела близкие значения — в среднем 27 %. Но доля транслокаций оказалась существенно более высокой и в среднем составила 48 %. Видимо, не исключается вероятность того, что воздействие излучений с высокими плотностями ионизации обеспечивает некоторые преимущества для формирования симметричных обменных aberrаций по сравнению с несимметричными.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы классическим метафазным и FISH-методами закономерности образования нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при облучении ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками: γ -лучами в дозах 1–7 Гр, ускоренными протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ ~0,218 кэВ/мкм) в дозах 0,15–3,6 Гр и ионами азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~77 кэВ/мкм) в дозах 0,5–3,0 Гр. Выявлены количественные и качественные особенности их действия по цитогенетическим показателям.

2. Установлена с использованием FISH-метода высокая частота стабильных aberrаций хромосом-1 и -2 (транслокации и инсерции) при действии ионизирующих излучений разного качества. Основная часть стабильных aberrаций представлена транслокациями хромосом. Данный тип нарушений составляет значительную часть от общего числа хромосомных aberrаций: при γ -облучении и действии протонов их вклад достигает ~40–45%, при облучении ионами азота на их долю приходится ~25%.

3. В экспериментах с использованием FISH-метода выявлен линейно-квадратичный характер зависимостей от дозы общего числа хромосомных aberrаций, частоты дицентриков и транслокаций хромосом-1 и -2 при действии редкоионизирующих излучений и показан линейный характер дозовых зависимостей для числа клеток с aberrациями и частоты фрагментов. Аналогичный характер дозовых зависимостей получен при анализе хромосомных aberrаций классическим метафазным методом.

4. Облучение ускоренными ионами азота характеризуется линейным характером дозовых зависимостей разных цитогенетических показателей при оценке классическим метафазным и FISH-методами. По тесту частоты образо-

вания аберрантных клеток и дицентриков хромосом при дозах ≥ 2 Гр отмечено отклонение от линейности со снижением величин радиационно-индуцированных эффектов.

5. Установлено отсутствие различий между хромосомой-1 и хромосомой-2 по частотам повреждений при действии излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне (протоны и ионы азота).

6. Показано, что частота образования транслокаций, выявленных FISH-методом, превышает частоту возникновения дицентриков хромосом-1 и -2 в 4,3; 1,4 и 3,5 раз при действии γ -лучей, протонов и ионов азота соответственно.

7. Выявлена методом FISH высокая частота образования фрагментов хромосом-1 и -2 (до 50% от общего числа хромосомных aberrаций) при облучении клеток ионами азота. При действии γ -лучей и протонов доля фрагментов составляет $\sim 25\%$.

8. Проведена оценка относительной биологической эффективности протонов с энергией 1 ГэВ и ионов азота с энергией 50 МэВ/нуклон. Коэффициенты ОБЭ протонов и ионов азота по выходу транслокаций составляют 1,1 и 3,1 соответственно. По другим цитогенетическим показателям коэффициенты ОБЭ протонов близки к единице. Коэффициенты ОБЭ ускоренных ионов азота находятся в пределах 2,0–2,6 при стандартном метафазном методе и 3,1–6,0 при анализе хромосом FISH-методом.

9. Предложен модифицированный математический метод для пересчета на полный геном частот транслокаций, дицентриков и фрагментов, выявляемых FISH-методом при “окрашивании” флуоресцентными красителями в разные цвета нескольких пар хромосом. Анализ результатов экспериментальных данных свидетельствует о более высокой радиочувствительности хромосом-1 и -2 среди других хромосом генома человека.

10. Получены калибровочные кривые по частоте стабильных aberrаций (транслокаций) хромосомы-1, которые могут быть использованы для целей биологической дозиметрии в случаях неконтролируемого облучения человека γ -лучами, высокоэнергетичными протонами, а также тяжелыми ионами с ЛПЭ в пределах 70–80 кэВ/мкм. В исследованных диапазонах доз точность оценки дозы редкоизионизирующих излучений составляет 7–15%, для ионов азота $\sim 20\%$.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Lukašová E., Repin M.V., Govorun R.D., Krasavin E.A., Horneck G., Kozubek S., 1995, Human lymphocytes chromosome-1-aberrations induced by γ -rays identified by fluorescence *in situ* hybridization. In: "Radiation Biology and its Application in Space Research. Mutation Induction by Ionizing Radiation." Eds. S. Kozubek, G. Horneck. Proc. of the Symp., 10–12.11.1994, Nedvědice, Czech Republic. Kiramo, 1995, pp. 250–255.
2. Репин М.В., Говорун Р.Д., Лукашова Е., Красавин Е.А. и Козубек С., 1996, Стабильные и нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека *in vitro* после γ -облучения. // Радиационная биология и радиоэкология. Т. 36. Вып. 6. С. 848–851.
3. Репин М.В., Говорун Р.Д., Лукашова Е., Козубек С. и Красавин Е.А., 1997а, FISH-анализ стабильных и нестабильных aberrаций хромосомы-1, индуцируемых γ -лучами и ускоренными ионами азота в лимфоцитах крови человека. // Тез. Межд. симп. "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии", 22–25 января 1997, Москва, Дубна. С. 54.
4. Репин М.В., Говорун Р.Д., Красавин Е.А., Лукашова Е. и Козубек С., 1997б, FISH-анализ стабильных и нестабильных aberrаций хромосомы-1, индуцируемых γ -лучами и ускоренными ионами азота в лимфоцитах крови человека. — Тр. Межд. симп. "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии", 1997, Дубна. Том 2. С. 49–56.
5. Lukášová E., Kozubek S., Govorun R.D., Kozubek M., Kroha V., Rýznar L. and Repin M.V., 1997, Aberrations induced by three different kinds of radiation in chromosomes 1, 2 and Y human lymphocytes. // Abstr. NATO-Advanced Research Workshop: "Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation". 6–10 October, 1997, Brno, Czech Republic, p. 48.
6. Krasavin E.A., Govorun R.D., Fedorenko B.S., Petrov V.M., Kozubek S., Lukášová E., Repin M.V. and Druzhinin S.V., 1997, Cytogenetic effects of heavy ions in human lymphocytes. JINR, E19-97-170, Dubna, 1997, 14 pp.
7. Govorun R.D., Lukašová E., Kozubek S., Repin M.V., Krasavin E.A. and Kroha V., 1988, Induction of aberrations in human lymphocytes by γ -rays and fast heavy ions. // JINR. E-19-98-31. Dubna, 1997, 19 pp.
8. Krasavin E., Govorun R., Repin M., Tymoshenko G., Lukashova M. and Kozubek S., 1999, Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced by 1 GeV

protons *in vitro*. In: 10th Annual Space Radiation Health Investigators' workshop, BNL, NASA, USRA. 13–16 June, Upton, N.Y., USA., 1999, p. 38.

9. Lukášová E., Kozubek S., Govorun R.D., Repin M.V., Rýznar L., Krasavin E., Kozubek M. and Kroha V., 1999, Aberration induced in chromosomes 1, 2 and Y of human lymphocytes by three types of different LET value as detected by FISH. In: NATO Science Series 2: Environmental Security, Vol. 55. Eds.: Baumstark-Khan C., Kozubek S. and Horneck G., Kluwer Academic Publishers, 1999, pp. 195–202.

Рукопись поступила в издательский отдел
26 октября 2000 года.

Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 27.10.2000
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 1,58
Тираж 100. Заказ 52313

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области