## ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 575.224.23:612.112.94:614.8

# ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДА FISH ПРИ НЕРАВНОМЕРНОМ ВНУТРЕННЕМ ОБЛУЧЕНИИ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНОГО ПОДХОДА

© 2019 г. Е. И. Толстых<sup>1, \*</sup>, М. О. Дегтева<sup>1</sup>, А. В. Возилова<sup>1</sup>, А. В. Аклеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, 454076 Россия

\*e-mail: evgenia@urcrm.ru Поступила в редакцию 24.04.2019 г. После доработки 20.05.2019 г. Принята к публикации 22.05.2019 г.

Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) позволяет оценивать число стабильных хромосомных аберраций (транслокаций) в Т-лимфоцитах крови человека через десятилетия после радиационного воздействия, поэтому он используется для ретроспективной оценки доз облучения красного костного мозга (ККМ). Анализ результатов цитогенетических исследований у лиц, облучив-шихся в 1950-е годы <sup>89, 90</sup>Sr, который локально облучает ККМ, показал, что оценка доз на основе данных FISH приводит к занижению реальной дозы, оцененной на основе измерений содержания <sup>90</sup>Sr в организме. Была оценена зависимость доза–эффект и определена частота транслокаций на 1 Гр дозы облучения ККМ и Т-лимфоцитов у доноров, проживавших в прибрежных селах р. Теча (n = 178; число транслокаций = 2389; число геном-эквивалентов GE = 96446). Для оценки доз были использованы последняя версия дозиметрической системы р. Теча и модель облучения Т-лимфоцитов. Статистический анализ показал, что частота транслокаций на 1000 GE на 1 Гр дозы на ККМ составила 8.0 ± 0.7; это статистически значимо ниже, чем аналогичная величина, оцененная для работников Селлафилда при внешнем облучении (11.6 ± 1.6). В то же время использование дозы на Т-лимфоциты и их предшественники привело к переоценке (повышению) угла наклона дозовой кривой до 11.8 ± 1.6 на 1 Гр на 1000 GE, что хорошо согласуется с опубликованными данными. Полученные оценки фоновых частот транслокаций также оказались близкими к опубликованным значениям для необлученных доноров. Это свидетельствует о правомерности использования модельного подхода к оценкам доз на Т-лимфоциты и их предшественники и о необходимости учета сложной динамики Т-клеток при интерпретации цитогенетических данных в целях биодозиметрии.

*Ключевые слова:* транслокации, FISH, Т-лимфоциты, <sup>90</sup>Sr, дозы облучения. **DOI:** 10.1134/S0016675819100138

Анализ хромосомных аберраций в Т-лимфоцитах периферической крови признан в качестве одного из важных методов биодозиметрии [1-4]. Метод флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) позволяет оценивать число стабильных хромосомных аберраций (транслокаций), индуцированных облучением, в лимфоцитах крови человека. Общепринятая точка зрения указывает [1], что "при ретроспективной биологической дозиметрии, спустя десятилетие или более после воздействия, когда транслокации измеряются методом FISH, дозовая оценка представляет собой среднюю дозу на активный костный мозг. Связано это с тем, что первоначально облучению подверглись стволовые клетки – предшественники лимфоцитов, которые собственно и исследуются". Существуют калибровочные кривые, связывающие число транслокаций с известной дозой облучения, рекомендованные для оценки дозы на красный костный мозг (**ККМ**) [3].

Однако анализ данных FISH у лиц, облучившихся <sup>89,90</sup>Sr в 1950-е гг. в прибрежных населенных пунктах р. Теча, показал, что оценка доз с использованием данных по частоте транслокаций приводит к занижению реальной дозы на ККМ, оцененной на основе измерений содержания <sup>90</sup>Sr в организме [5, 6]. Поскольку <sup>90</sup>Sr является метаболическим аналогом кальция, он встраивается в кристаллы гидроксиапатита костной ткани и надолго задерживается в организме. Средняя длина пробега электрона спектра <sup>90</sup>Sr и дочернего <sup>90</sup>Y составляет в кости около 3 мм, что приводит к хроническому локальному облучению ККМ, расположенного в костных полостях. Жители прибрежных сел р. Теча получили значительные количества <sup>90</sup>Sr (в среднем около трех млн Бк), поступившего в организм с загрязненной речной водой и продуктами питания местного производства [7], при этом максимум поступления пришелся на 1950—1953 гг. В этой связи нельзя отбросить предположение, что при локальном облучении ККМ часть Т-клеток, сформированных до начала облучения, могла получить значительно более низкие дозы, поскольку эти клетки (и их предшественники) не находились в костном мозге.

Изучение динамики Т-клеток привело к созданию модели облучения Т-лимфоцитов с учетом части Т-клеточных предшественников в костном мозге, облучения Т-лимфоцитов в экстра-скелетных лимфоидных тканях (ЭЛТ) и с учетом рециркуляции лимфоцитов в красном костном мозге [8]. Модель основана на концепции Т-клеточного рода (T-Genus), объединяющего всех потомков Т-прогенитора с наследуемыми специфическими аберрациями, которые могли образоваться в ККМ. Модель, в частности, использует результаты математического моделирования гомеостаза Т-лимфоцитов [9, 10].

Задачи настоящей работы: обобщить экспериментальные данные по цитогенетическим исследованиям стабильных хромосомных аберраций у жителей прибрежных сел р. Теча за период 1994— 2012 гг.; рассчитать для каждого донора дозу на Т-лимфоциты на основе разработанного модельного подхода; оценить зависимость доза—эффект и определить частоту транслокаций на 1 Гр дозы и фоновую частоту транслокаций; сопоставить полученные значения с аналогичными показателями, полученными в обобщающих международных исследованиях [11, 12], т.е. провести верификацию модели.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Цитогенетические исследования

Цитогенетические исследования стабильных хромосомных аберраций были выполнены для 178 доноров, проживавших в прибрежных пунктах р. Теча в период сбросов радиоактивных отходов. Эта группа была подробно описана ранее [8], количество проведенных анализов FISH составило 193, исследования выполнялись в период 1994-2012 гг. Возраст доноров на момент отбора образцов крови варьировал от 47 до 78 лет, число мужчин – 61. Подсчет аберраций был выполнен в цитогенетических лабораториях нескольких научных центров: в УНПЦ РМ (Россия). Институте радиобиологии им. Гельмгольца (Германия), лаборатории Public Health England (Великобритания), а также в Лейденском университетском медицинском центре (Нидерланды). Протоколы FISH и подробные описания подсчета хромосомных аберраций были даны в предыдущих работах [5, 6, 13]. Во всех случаях использовали цельнохромосомные зонды для окрашивания трех пар хромосом, которые покрывали около 23% генома. Всего было просчитано 96446 GE (геном-эквивалентов) и обнаружено 2389 транслокаций.

### *Оценка доз облучения красного костного мозга и экстра-скелетных лимфоидных тканей доноров*

Все доноры подвергались внешнему ү- и внутреннему γ-, β-облучению, в основном<sup>89,90</sup>Sr и <sup>137</sup>Сs [14]. Расчет доз для всех доноров был проведен с использованием последней версии дозиметрической системы р. Теча (TRDS-2016) [15], подходы к индивидуализации доз облучения были подробно описаны ранее [16]. Для оценок доз от <sup>89,90</sup>Sr в TRDS используются биокинетическая половозрастная модель для стронция [17], а также результаты прижизненных измерений содержания радионуклидов в организме, если таковые имелись для конкретного индивида. Следует отметить, что среди доноров, участвовавших в настоящем исследовании, 90% лиц прижизненно измерялись на спектрометре излучений человека для определения содержания <sup>90</sup>Sr в организме.

Вклад изотопов стронция в суммарную дозу на ККМ в разных дозовых группах варьировал от 52 до 85%, этот показатель свидетельствует о значительном вкладе локального облучения ККМ в суммарную дозу. Дозы рассчитывали с момента начала облучения до даты отбора проб крови.

Экстра-скелетные лимфоидные ткани, включающие тимус и другие лимфоидные органы, не могут быть значимо облучены при поступлении с рационом <sup>89,90</sup>Sr. Доза их облучения обусловлена равномерно распределенным в теле <sup>137</sup>Cs и внешним  $\gamma$ -излучением от загрязненной почвы пойменных земель. Доза на ЭЛТ, где в основном расположены лимфоциты, считалась равной поглощенной дозе в мышцах и рассчитывалась так же с использованием TRDS-2016.

#### Оценка доз облучения Т-лимфоцитов и их предшественников (модельный подход)

Модель облучения Т-лимфоцитов подробно была описана ранее [8]. При разработке модели принимались во внимание следующие особенности формирования пула Т-лимфоцитов периферической крови:

1. Все Т-лимфоциты происходят от Т-клеточных предшественников, которые формируются в костном мозге.

2. Т-предшественники через кровеносное русло мигрируют в тимус, где происходит формирование Т-лимфоцитов с уникальными Т-клеточными рецепторами.

3. Т-лимфоциты в периферических лимфоидных тканях образуют многоклеточные и часто

ГЕНЕТИКА том 55 № 10 2019

долгоживущие клоны клеток с одинаковыми Т-клеточными рецепторами; репертуар Т-клонов формируется в детстве и остается довольно стабильным в течение жизни (до 70 лет) [18–23].

4. При облучении Т-предшественника (прогенитора) в костном мозге потенциальный груз хромосомных аберраций несут все его потомки, т.е. целый набор Т-клонов с уникальными Т-клеточными рецепторами.

5. Все потомки одного прогенитора и сам прогенитор объединяются в Т-клеточный род, или Genus (TG), который является объектом моделирования [8].

Принималось, что продукция TG прямо пропорциональна продукции тимусом Т-лимфоцитов, и потеря TG в течение жизни не оказывает существенного влияния на возрастное соотношение представителей различных TG в периферической крови. В свою очередь, для оценки зависящей от возраста продукции тимусом Т-лимфоцитов использовали результаты модельных оценок Bains I [9, 10], которые базировались на экспериментальных данных по скорости пролиферации различных фракций Т-лимфоцитов, их общего количества в периферической крови.

Полная средневзвешенная лимфоцитарная доза  $D_{\rm L}$  рассчитывается как сумма двух доз: 1) средневзвешенная доза облучения Т-лимфоцитов, накопленная в период пребывания предшественников Т-клеток в ККМ ( $D_{\rm LP}$ ); 2) средневзвешенная доза на циркулирующие лимфоциты  $D_{\rm LC}$ , которая представляет собой дозу, накопленную лимфоцитами в период их циркуляции в организме человека. Таким образом, здесь и далее "доза на Т-лимфоциты" подразумевает средневзвешенную лимфоцитарную дозу, включающую дозу на Т-предшественники. Ниже приводится алгоритм расчетов доз облучения.

Средневзвешенная доза облучения Т-лимфоцитов, накопленная в период пребывания предшественников в ККМ ( $D_{LP}$ ), представляет собой дозу, накопленную прежде чем предшественники покинули ККМ и начали генерировать клонотипы Т-лимфоцитов в тимусе. Она рассчитывается как среднее значение, взвешенное в соответствии с долей потомков каждого предшественника в периферической крови на момент забора крови:

$$D_{\rm LP} = \frac{1}{P_{\rm TG}(age_{\rm s})} \int_{t_{\rm l}}^{t_{\rm s}} p_{\rm TG}(age) D_{\rm KKM}(t, age) dt, \qquad (1)$$

где t — календарное время (годы),  $t_1$  — год начала облучения,  $t_s$  — год забора крови;

 $age = t_1 - t_{birth}$  — возраст донора (лет), который варьирует от  $age_1 = t_1 - t_{birth}$  до возраста на момент забора крови  $age_s = t_s - t_{birth}$ ;

 $P_{TG}(age)$  – общее число Т-клеточных родов,

произведенных в период от рождения до указанного возраста (в отн. ед.), определяется как интеграл функции  $f_{TG}(age)$ :

$$P_{\text{TG}}(age) = \int_{0}^{age} f_{\text{TG}}(t) dt; \qquad (2)$$
$$f_{\text{TG}}(age) =$$

$$=\begin{cases} 0.5 + 0.5age, & 0 \le age \le 1; \\ \exp(-0.12(age - 1)), & 1 \le age < 8; \\ 0.4582 + \exp(-0.04(age - 8)), & 8 \le age < 20; \\ 0.2893 + \exp(-0.08(age - 20)), & age > 20; \end{cases}$$

 $p_{TG}(age)$  — число Т-клеточных родов (TG), произведенных за один год (в отн. ед.), которое рассчитывается интегрированием функции (3) для заданного возраста *age* 

$$p_{\mathrm{TG}}\left(age\right) = \int_{age}^{age+1} f_{\mathrm{TG}}\left(t\right) dt. \tag{4}$$

 $D_{\rm KKM}(t, age)$  — поглощенная доза на KKM, накопленная к возрасту *age* с момента начала облучения, которая представляет собой функцию календарного времени, возраста и времени проживания донора на загрязненных территориях.

Средневзвешенная доза на циркулирующие лимфоциты ( $D_{LC}$ ) представляет собой дозу, накопленную лимфоцитами в период их циркуляции в организме человека при радиационном облучении; во время циркуляции лимфоциты проводят 88% времени в экстра-скелетных лимфоидных тканях, а остальные 12% — в красном костном мозге [24].  $D_{LC}$  рассчитывается как среднее значение, взвешенное в соответствии с долей лимфоцитов, которые включены в режим циркуляции в каждом возрасте; а также с долей времени, проводимого циркулирующими лимфоцитами в ЭЛТ и ККМ:

$$D_{\rm LC} = \frac{1}{P_{\rm TG}(age_{\rm s})} \int_{t_1}^{t_{\rm s}} P_{\rm TG}(age) \times$$

$$\times \left[ 0.88 \dot{D}_{\rm ЭЛT}(t, age) + 0.12 \dot{D}_{\rm KKM}(t, age) \right] dt,$$
(5)

где  $P_{TG}(age)$  — число Т-клеточных родов, произведенных в течение периода от рождения до *age* и переключившихся в режим циркуляции (рассчитывается согласно (2) в отн. ед.);

 $\dot{D}_{\rm KKM}(t, age)$  — годовая мощность поглощенной дозы в KKM, которая является функцией календарного времени, возраста и истории облучения конкретного индивида;

 $\dot{D}_{ЭЛТ}(t, age)$  — годовая мощность поглощенной дозы в ЭЛТ, которая зависит от календарного времени, возраста, истории проживания кон-кретного донора на загрязненной территории.

ГЕНЕТИКА том 55 № 10 2019



**Рис. 1.** Статистические распределения доз облучения ЭЛТ (*a*), Т-лимфоцитов (*б*) и ККМ (*в*) в изучаемой выборке доноров.

Полная средневзвешенная лимфоцитарная доза  $D_{\rm L}$  рассчитывается как сумма (1) и (5):

$$D_{\rm L} = D_{\rm LP} + D_{\rm LC}.$$
 (6)

#### Статистический анализ

Для оценки связи между суммарной дозой облучения (доза на ККМ или полная средневзвешенная лимфоцитарная доза) и частотой транслокации был использован модуль AMFIT программного пакета EPICURE [25], позволяющий построить линейную модель регрессии Пуассона. Модель имеет общий вид:

$$Y(age, sex, dose) = Y_0(age, sex) + \beta \times dose,$$
 (7)

где Y (age, sex, dose) — ожидаемая частота транслокаций на 1000 GE, age — возраст на момент забора

ГЕНЕТИКА том 55 № 10 2019

крови, *dose* — накопленная доза;  $Y_0$  (*age*, *sex*) — ковариантно-специфическая фоновая частота транслокаций на 1000 GE, зависящая от возраста *age* и пола sex;  $\beta$  — увеличение частоты транслокаций на 1000 GE на 1 Гр (угол наклона линии регрессии).

Переменные были распределены по следующим категориям: возраст (годы) – четыре категории (<50, 50–60, 60–70, >70); доза на ККМ (Гр) – шесть категорий (0–0.5, 0.5–1, 1–1.5, 1.5–2, 2–2.5, >2.5); доза на Т-лимфоциты (Гр) – шесть категорий (0–0.25, 0.25–0.5, 0.5–0.75, 0.75–1; 1–1.3, >1.3); пол – две категории.

Для выбранной группы доноров были выполнены два варианта расчетов дозовой зависимости частоты транслокаций с использованием программы EPICURE: 1) частота транслокаций на 1 Гр дозы на ККМ; 2) частота транслокаций на 1 Гр дозы на Т-лимфоциты. В обоих случаях значения параметров вычисляли с помощью метода максимального правдоподобия, а значения *P* оценивали на основании двусторонних тестов.

Так как в группе доноров не было лиц с нулевыми дозами облучения, значения фоновой частоты транслокаций (параметр  $Y_0$ ) получали методом экстраполяции линейной регрессии к нулевой дозе.

Вычисления стандартных параметров и построение рисунков проводили с помощью лицензионных программ Microsoft Excel и Sigma Plot на персональном компьютере.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Анализ доз облучения доноров

Рис. 1 представляет статистические распределения доз на ККМ, ЭЛТ и Т-лимфоциты в изучаемой выборке доноров. Как видно, дозы на лимфоциты занимают промежуточное положение между дозами на ККМ и ЭЛТ. Максимальное значение дозы на ККМ составило 3.6 Гр, на Т-лимфоциты – 2.3 Гр, на ЭЛТ – 0.9 Гр. Рис. 1 иллюстрирует неравномерность облучения при накоплении в организме<sup>89,90</sup>Sr. Следует отметить, что максимальные мощности дозы наблюдались в течение короткого промежутка времени, совпадающего с периодом сбросов радиоактивных отходов в р. Теча.

### Анализ дозовых зависимостей частоты транслокаций

При всех вариантах расчетов не было выявлено влияния пола на частоту транслокаций, поэтому далее приведены результаты для объединенной по полу группы доноров.

Табл. 1 представляет частоту транслокаций в расчете на 1 Гр дозы облучения, т.е. угол наклона кривой доза—эффект. Значения угла наклона (угловые коэффициенты) используются при переходе от

N⁰	Источник данных	Орган-мишень для оценки доз	Характер облучения	Частота транслокаций, среднее ± SE
1	[11]	ККМ	Внешнее всего тела, доза на ККМ совпадает с дозой на лимфоциты	$11.6 \pm 1.6$
2	[6]	ККМ	Внутреннее, локальное облучение ККМ, вклад в дозу <sup>89,90</sup> Sr — 96% <sup>a</sup>	$7.0 \pm 0.2^{6}$
3	Настоящее исследование	ККМ	Внутреннее и внешнее, вклад в дозу на ККМ <sup>89,90</sup> Sr – 54–85% <sup>в</sup>	$8.0 \pm 0.7^{6}$
4	Настоящее исследование	Т-лимфоциты	То же	$11.8 \pm 1.2$

Таблица 1. Частота транслокаций на 1 Гр дозы облучения на 1000 GE

<sup>а</sup> Оставшиеся 4% дозы на ККМ обусловлены незначительным внешним облучением и внутренним облучением за счет <sup>137</sup>Сs.

<sup>6</sup> Статистически значимые различия со значением № 1 [11].

<sup>в</sup> Средний вклад в дозовых группах.

числа транслокаций к дозе облучения человека после проведения цитогенетических исследований в целях биодозиметрии. Для сравнения в табл. 1 приведены результаты исследования [11], выполненного на основе FISH, где для построения линейной регрессии Пуассона также был использомодуль AMFIT программного ван пакета EPICURE. В этой обобщающей работе оценивали частоту транслокаций у работников ядерного предприятия в Селлафилде (Sellafield nuclear facility, Cumbria, UK; n = 459), подвергавшихся в основном внешнему облучению. Это означает, что для них дозы на ККМ и Т-лимфоциты практически совпадают, и нет необходимости учитывать облучение Т-клеток в различных отделах тела. Кроме того, работники, как и в случае с донорами из когорты р. Теча, подвергались пролонгированному облучению с небольшой мощностью дозы. Таким образом, результаты этого исследования могут служить своеобразным "золотым стандартом" для оценок связи между дозой на Т-лимфоциты и частотой хромосомных аберраций. Также для сравнения приведены данные по небольшой группе доноров (n = 26) из прибрежных сел р. Теча, для которых неравномерность облучения выражена максимально, и вклад облучения в дозу на ККМ достигает 95-99%, т.е. имело место локальное облучение ККМ [6].

Как следует из табл. 1, выделяются две пары близких значений частоты транслокаций на 1 Гр. В первом случае это оценки № 1 и 4, которые базируются на дозах на ККМ, совпадающих с дозами на лимфоциты, и непосредственно на лимфоцитарных дозах. Во втором случае это оценки № 2 и 3, полученные для доноров с преимущественным локальным облучением ККМ. Во втором случае частота транслокаций на 1 Гр существенно ниже.

Статистический анализ показал, что частота транслокаций на 1000 GE на 1 Гр дозы на ККМ составила  $8.0 \pm 0.7$ ; статистически это значимо ниже, чем аналогичная величина, оцененная для работников Селлафилда при внешнем облучении (11.6  $\pm$  1.6). В то же время использование для оценок доза—эффект дозы на Т-лимфоциты и их предшественники привело к переоценке (повышению) угла наклона дозовой кривой, который составил 11.8  $\pm$  1.6 на 1 Гр на 1000 GE, что хорошо согласуется с данными по внешнему облучению.

Как уже говорилось, в нашем исследовании дозы на Т-лимфоциты и их предшественники были впервые рассчитаны с использованием модели, учитывающей облучение Т-клеток как в костном мозге, так и во внескелетных тканях. Сопоставление наших оценок и опубликованных данных это по сути один из способов верификации модели, а хорошая сходимость результатов по частоте транслокаций свидетельствует о правомерности использования нашего модельного подхода.

### Анализ возрастной зависимости частоты транслокаций у необлученных доноров

В табл. 2 представлены оценки фоновых значений частоты транслокаций в зависимости от возраста, полученные при построении регрессии с дозами на Т-лимфоциты и их предшественники. Для сравнения приведены значения, полученные в рамках международного исследования влияния различных нерадиационных факторов на частоту транслокаций [12], количество доноров интересующего возрастного диапазона n = 817. Как видно, во всех случаях наблюдается увеличе-

Возраст, лет	Настоящее исследование, среднее (границы SE)	Данные международного исследования [12], оба пола, среднее (95% CI)
<50	7.2 (5.3–9.8)	7.90 (7.00–10.4)
50-60	10.2 (8.5–12.2)	8.85 (8.00–13.5)
60-70	17.1 (16.0–18.4)	12.1 (10.5–13.8)
>70	17.5 (16.5–18.6)	16.1 (13.6–21.4)

Таблица 2. Фоновая, зависящая от возраста, частота транслокаций на 1000 GE в сопоставлении с опубликованными данными

ние фоновой частоты с увеличением возраста. Найденные нами оценки близки к фоновым значениям для необлученных доноров [12], что может рассматриваться как еще один элемент верификации модели облучения Т-лимфоцитов.

В заключение следует отметить, что верификация модельных оценок доз на Т-лимфоциты является сложной задачей, которая не имеет прямого решения, так как геном Т-лимфоцитов сам выступает в качестве биодозиметра, "хранящего" индуцированные транслокации. Однако полученная регрессионная зависимость доза-эффект (зависимость частоты транслокаций от лимфоцитарной дозы) позволила провести сопоставление с опубликованными данными по двум параметрам: по угловому коэффициенту линии регрессии и по фоновым частотам транслокаций, число которых увеличивается с возрастом. Во всех случаях наблюдается хорошая сходимость результатов. Необходимость учета неравномерности облучения и использования доз на Т-лимфоциты можно проиллюстрировать следующим примером: предположим, что у человека с неизвестной дозой облучения определили частоту транслокаций; известно, что его облучение обусловлено <sup>90</sup>Sr. Чтобы перейти к дозе на ККМ, использовали коэффициент, полученный для условий внешнего равномерного облучения (11.6 на 1 Гр на 1000 GE [11]) или полученный при облучении лимфоцитов *in vitro* (15 на 1 Гр на 1000 GE [3]). В результате реальная доза на ККМ может быть занижена в 1.5-2 раза. Таким образом, без учета неравномерности облучения и сложной динамики Т-клеток доза облучения ККМ при использовании цитогенетических методов может быть существенно недооценена.

Авторы выражают благодарность С.Б. Епифановой за помощь в работе с программой EPICURE и В.А. Кривощапову за разработку программы для расчетов доз на Т-лимфоциты и их предшественники. Работа была поддержана Федеральным медико-биологическим агентством России и Департаментом энергетики США в рамках Российско-Американского проекта 1.1.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. IAEA Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual Technical Reports. Series 405. 2001. http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/6303/Cytogenetic-Analysis-for-Radiation-Dose-Assessment-A-Manual.
- 2. *Hande M.P., Azizova T.V., Burak L.E. et al.* Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study // Genes Chromosomes Cancer. 2005. V. 44. № 1. P. 1–9.
- 3. Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F. et al. Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications // Radiat. Prot. Dosimetry. 2005. V. 113. № 4. P. 396–402. https://doi.org/10.1093/rpd/nch452
- 4. Пилинская М.А., Дыбский С.С., Скалецкий Ю.Н. Опыт использования метода FISH для реконструкции индивидуальных доз облучения у ликвидаторов Чернобыльской аварии в рамках Украинско-Американского проекта "Лейкемия" // Цитология и генетика. 2006. Т. 40. № 3. С. 34–39.
- Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O. et al. Preliminary FISH-based assessment of external dose for residents exposed on the Techa River // Radiat. Res. 2012. V. 177. № 1. P. 84–91.

- 6. *Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O. et al.* FISH analysis of translocations induced by chronic exposure to Sr radioisotopes: second set of analysis of the Techa River Cohort // Radiat. Prot. Dosimetry. 2014. V. 159. № 1–4. P. 34–37. https://doi.org/10.1093/rpd/ncu131
- Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M. et al. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa Riverside residents: Strontium-90 // Health Phys. 2011. V. 101. P. 28–47. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e318206d0ff
- 8. Tolstykh E.I., Degteva M.O., Vozilova A.V., Anspaugh L.R. Local bone-marrow exposure: how to interpret the data on stable chromosome aberrations in circulating lymphocytes? (some comments on the use of FISH method for dose reconstruction for Techa Riverside residents) // Radiat. Environ. Biophys. 2017. V. 56. № 4. P. 389–403. https://doi.org/10.1007/s00411-017-0712-7
- Bains I. Mathematical Modelling of T Cell Homeostasis. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy of the University College London, 2010. http://discovery.ucl.ac.uk/20159/1/20159.pdf
- Bains I., Yates A.J., Callard R.E. Heterogeneity in thymic emigrants: implications for thymectomy and immunosenescence // PLoS One. 2013. V. 8(2): e49554. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049554
- Tawn E.J., Curwen G.B., Jonas P. et al. Chromosome aberrations determined by FISH in radiation workers from the sellafield nuclear facility // Radiat. Res. 2015. V. 184. № 3. P. 296–303. https://doi.org/10.1667/RR14125.1
- 12. Sigurdson A.J., Ha M., Hauptmann M. et al. International study of factors affecting human chromosome translocations // Mutat. Res. 2008. V. 652. № 2. P. 112–121. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.01.005
- 13. Bauchinger M., Salassidis K., Brasellmann H. et al.
- 13. Batteringer M., Satassials K., Braselmann H. et al. FISH-based analysis of stable translocations in a Techa River population // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 7. P. 605–612.
- 14. Дёгтева М.О., Шагина Н.Б., Воробьева М.И. и др. Радиационная биология. Современное представление о радиоактивном загрязнении реки Теча в 1949–1956 гг. // Радиац. биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 5. С. 523–534.
- 15. Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I. et al. Enhancements in the Techa River dosimetry system: TRDS-2016D Code for reconstruction of deterministic

estimates of dose from environmental exposures // Health Phys. 2019. Apr 5. https://doi.org/10.1097/HP.000000000001067

- 16. Шагина Н.Б., Дегтева М.О., Толстых Е.И. и др. Снижение неопределенностей доз внутреннего облучения от <sup>90</sup>Sr для расширенной когорты реки Теча // Вопр. радиац. безопасности. 2006. Спец. вып. № 1. С. 5–25.
- 17. Shagina N.B., Tolstykh E.I., Degteva M.O. et al. Age and gender specific biokinetic model for strontium in humans // J. Radiol. Prot. 2015. V. 35. № 1. P. 87–127. https://doi.org/10.1088/0952-4746/35/1/87
- Britanova O.V., Shugay M., Merzlyak E.M. et al. Dynamics of individual T cell repertoires: From cord blood to centenarians // J. Immunol. 2016. V. 196. N
   № 12. P. 5005–5013. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600005
- Naumova E.N., Gorski J., Naumov Y.N. Simulation studies for a multistage dynamic process of immune memory response to influenza: experiment *in silico* // Ann. Zool. Fenn. 2008. V. 45. P. 369–384.
- 20. Yoshida K., Cologne J.B., Cordova K. et al. Aging-related changes in human T-cell repertoire over 20 years delineated by deep sequencing of peripheral T-cell receptors // Exp. Gerontol. 2017. V. 1. № 96. P. 29–37. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.05.015
- 21. Britanova O.V., Putintseva E.V., Shugay M. et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling // J. Immunol. 2014. V. 192. № 6. P. 2689–2698. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302064
- 22. Attaf M., Huseby E., Sewell A.K. αβ T cell receptors as predictors of health and disease // Cell Mol. Immunol. 2015. V. 12. № 4. P. 391–399. https://doi.org/10.1038/cmi.2014.134
- 23. Израельсон М., Касацкая С., Погорелый М. и др. Анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов // Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 347-352.
- 25. Hirosoft. Epicure: Fast, interactive software for the analysis of medical, public health, epidemiologic, econometric, and reliability data Seattle, WA: Hirosoft Intern. Corporation. 1998. V. 2 (10).

# Interpretation of the Fish Method Results after Non-Uniform Exposure of Human Body with Use of the Model Approach

E. I. Tolstykh<sup>a, \*</sup>, M. O. Degteva<sup>a</sup>, A. V. Vozilova<sup>a</sup>, and A. V. Akleyev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454076 Russia \*e-mail: evgenia@urcrm.ru

The fluorescent in situ hybridization (FISH) method allows estimating the number of stable chromosomal aberrations (translocations) in T-lymphocytes of human blood decades after radiation exposure, that is why it is used for retrospective assessment of radiation doses to red bone marrow (RBM). Analysis of the results of cytogenetic studies in persons exposed in the 1950s on the River Techa due to <sup>89,90</sup>Sr, which locally irradi-

ates RBM, showed that dose assessment based on FISH data leads to an underestimation of the real dose, derived from measurements of <sup>90</sup>Sr in the body. The purpose of this study was to assess the dose-response relationship and determine the frequency of translocations per 1 Gy of the radiation dose to RBM and T-lymphocytes for donors living in Techa riverside villages with an essential contribution of <sup>89, 90</sup>Sr to RBM dose (n = 178; translocation yield = 2.389; number of genome-equivalents GE = 96.446). The latest version of the Techa River dosimetry system and the model of T-lymphocyte exposure were used to estimate doses. Statistical analysis showed that the frequency of translocations per 1000 GE per 1 Gy of RBM dose was  $8.0 \pm 0.7$ ; which is statistically significantly lower than the respective estimated for Sellafield workers who were externally exposed (11.6 ± 1.6). At the same time, the use of the dose in T-lymphocytes and their precursors led to an increase in the slope of dose-response curve to  $11.8 \pm 1.6$  per 1 Gy per 1000 GE, which agrees well with the published data. The obtained estimates of the background frequencies of translocations also turned out to be close to the published data for unexposed donors. This suggests the appropriateness of using a model approach to estimating doses in T-lymphocytes and their progenitors and the need to take into account the complex dynamics of T-cells when interpreting cytogenetic data for the purposes of bio-dosimetry.

Keywords: translocations, FISH, T-lymphocytes, <sup>90</sup>Sr, radiation doses.