

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ЧАСТОТЫ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И МИКРОЯДЕР В Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

© 2019 г. А. В. Возилова^{1, *}, Ю. Р. Ахмадуллина^{1, 2}

¹Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, 454076 Россия

²Челябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

*e-mail: vozilova@urcrm.ru

Поступила в редакцию 24.04.2019 г.

После доработки 26.05.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

В современном мире возрастает воздействие ионизирующего излучения на человека в диапазоне низких доз (медицинские диагностические процедуры и т.д.). Вопрос о влиянии малых доз на здоровье человека – дискуссионный и актуальный. Известно, что в популяции существует до 15% людей, у которых ответ на облучение будет отличаться от ожидаемого, что по литературным данным связано с особенностями генома. Исследование влияния хронического низкоинтенсивного облучения (диапазон доз на красный костный мозг от 3 до 4600 мГр), которому подверглись жители прибрежных сел р. Теча (Южный Урал), на радиочувствительность Т-клеток *in vivo* и *in vitro* при дополнительном γ -облучении Т-лимфоцитов периферической крови (0.5, 1 и 2 Гр) является актуальным. В качестве маркеров облучения использовали цитогенетические показатели – частоту нестабильных хромосомных aberrаций и частоту микроядер. Радиочувствительными считались лица, у которых полученные значения показателей превышали 90-й перцентиль. На основании результатов проведенного исследования были сделаны следующие выводы: доноров с повышенной радиочувствительностью было около 10%, причем на увеличение цитогенетических результатов не влияла доза хронического облучения красного костного мозга; не выявили влияния возраста на радиочувствительность в исследуемом возрастном диапазоне доноров (49–89 лет). В большинстве случаев не выявили воспроизводимого эффекта радиочувствительности у одного и того же донора при разных режимах облучения.

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, микроядерный тест, хромосомные aberrации, Т-лимфоциты периферической крови.

DOI: 10.1134/S0016675819100151

В современных условиях велико влияние низких доз облучения на человека. Многочисленные медицинские процедуры, неблагоприятная экологическая обстановка – все это увеличивает присутствие радиационного фактора в жизни людей. В случае же аварийного облучения или нештатной ситуации для профессионалов и населения цель радиационной защиты состоит в предотвращении детерминированных эффектов и в ограничении стохастических эффектов у человека в клинической практике [1]. Для достижения этой цели необходимо наиболее точно определить уровень повреждений ДНК, поскольку они играют роль в реализации эффектов облучения в организме человека и служат основой для определения дозы облучения человека при отсутствии физической дозиметрии или для валидации ее оценок.

Наиболее распространенный метод для определения повреждений ДНК – цитогенетический. В основе такого подхода лежит подсчет частоты хромосомных aberrаций или частоты микроядер в Т-клетках периферической крови человека, которые могут при определенных ограничениях быть пересчитаны в дозу облучения с использованием калибровочной кривой доза–эффект [2].

Накопленные научные данные говорят в пользу существующих вариаций индивидуальных особенностей организмов на воздействие излучения, что также является ограничением для методов биодозиметрии. Так, отмечалось, что даже у людей с острой лучевой болезнью, переживших атомную бомбардировку в г. Хиросима и г. Нагасаки (Япония), наблюдались индивидуальные

различия в интенсивности выпадения волос, в реакции гемопоэза и т.д. [3].

Одним из перспективных направлений в исследованиях в области радиационной генетики является изучение механизмов индивидуальной радиочувствительности человека. Актуальность этой темы обусловлена помимо возможных аварийных ситуаций, необходимостью профессионального отбора специалистов, контактирующих с ионизирующим излучением, выбором источников и адекватных доз излучения в ходе лучевой терапии, обоснованием необходимости большого количества медицинских диагностических процедур, уточнением норм радиационной безопасности для населения и персонала атомных производств [4].

Под индивидуальной радиочувствительностью понимают способность биологического объекта определенным образом реагировать на действие ионизирующей радиации. Оценить индивидуальную радиочувствительность возможно с использованием нескольких критериев: разной реакцией пациентов на лучевую терапию, реакцией здоровых тканей в отдаленном времени после проведения лучевой терапии, наличием в популяции наиболее предрасположенных к радиационно-индуцированным ракам индивидуумов, межличностной вариативностью в репарации разрывов ДНК или скоростью элиминирования поврежденных клеток, разной реакцией клеток на действие ионизирующей радиации при определенных дозах и мощностях доз [5]. Так, индукция двойных разрывов ДНК, которые реализуются в хромосомные aberrации и частично в микроядра, считается проявлением индивидуальной чувствительности организма на действие радиации [2]. В последнее время большое внимание исследователей уделяется не прямому влиянию радиации на клетку (теория мишени), а так называемым “немишенным эффектам”, которые описаны как “эффект свидетеля”, “абскопальный эффект”, “адаптивный ответ”, геномная нестабильность, задержка апоптоза [6].

Одним из наиболее важных вопросов в современной радиобиологии является вопрос о корреляции особенностей генома организма и его радиочувствительности. Так, известно, что лучевая терапия особенно фатальна для носителей гомозигот гена ATM, и может запустить рак с высокой вероятностью у ATM-, BRCA1- и BRCA2-, TP53-гетерозиготных носителей. Считается, что все генные мутации с предрасположенностью к радиочувствительности или раку могут быть представлены в популяции в существенной пропорции от 5 до 15% [7].

Анализ литературных данных показывает, что радиочувствительность организма по-разному проявляется при воздействии малых и высоких доз ионизирующего излучения. В работе [8] про-

явление индивидуальной радиочувствительности преимущественно с применением флуоресценции для маркера γ H2AX регистрировали при воздействии в дозе 1 мГр. Отмечено, что в нормальных клетках кожи человека при малых (10 мГр) и высоких (2 Гр) дозах излучения изменения в экспрессии наблюдались в разных наборах генов [9]. При работе с микрочипами ДНК (10500 генных зондов) было выявлено, что среди 853 зондов экспрессия 214 генов специфически определялась низкими дозами (10 мГр), а экспрессия 370 других генов – при воздействии высокими дозами (2 Гр). Набор из 140 известных генов, отвечающих на воздействие низкими дозами, включал в себя главным образом гены гомеостаза, клеточной коммуникации, сигнализации, структуры мембран, цитоскелета, РНК и синтеза белка, хроматина, энергетического метаболизма, стресса, гибели клеток и транспорта. Что было особенно важно, в условиях низких доз редко экспрессировались гены репарации ДНК. Таким образом, клеточные и тканевые реакции на облучение в диапазоне низких доз весьма специфичны и отличаются от реакций, вызываемых высокими дозами.

При изучении эффектов облучения у человека в условиях *in vitro* и *in vivo* было сделано предположение, что постановка вопроса о существовании радиочувствительных и радиостойчивых генотипов не так однозначна, как представлялось радиобиологам ранее. Авторы предполагают, что следует разделять, по меньшей мере, три частично пересекающиеся группы полиморфных локусов генов, изменчивость которых ассоциирована с предрасположенностью к повышенному соматическому мутагенезу, а именно: 1) локусы, ассоциированные с уровнем спонтанных aberrаций хромосом (например, локусы генов *GSTM1*, *GSTT1*); 2) локусы, ассоциированные с радиочувствительностью при облучении *in vivo* (возможно ген *SOD2*); 3) локусы, изменчивость которых определяет радиочувствительность хромосом при облучении *in vitro* (например, *CYP1A1*, *CAT*). Так, было показано, что частоты спонтанных (*in vivo*) и индуцированных (*in vitro*) aberrаций хромосом ассоциированы с различными группами генов. Крупные делеции генов детоксикации чаще были сопряжены с пониженным уровнем цитогенетических нарушений. Большинство SNP, в том числе связанные с репарацией ДНК, слабо коррелировали с радиочувствительностью хромосом [10, 11]. Приведенные данные могут служить доказательством в пользу того, что за время эволюции клетки выработали несколько разных механизмов или путей клеточного ответа, которые могут взаимозаменять или дополнять друг друга в стрессовых ситуациях. А генетическое разнообразие, которым обладают клетки одной ткани, позволяет им по-разному реагировать на вредное воздей-

ствии (в нашем случае γ -радиация), адаптироваться к новым условиям или запускать механизмы апоптоза без ущерба деятельности для ткани и организма в целом.

Цель настоящего исследования – изучить влияние хронического низкоинтенсивного облучения организма на радиочувствительность Т-клеток периферической крови при γ -облучении *in vitro*. Для этого были взяты данные из цитогенетической базы УНПЦ РМ, которые были получены при обследовании жителей Южного Урала, подвергавшихся хроническому кумулятивному облучению в диапазоне доз от 0.003 до 4.6 Гр. Маркерами повреждения ДНК были выбраны нестабильные хромосомные aberrации (НХА) обменного типа и частота микроядер (МЯ) в цитокинез-блокированных митозах. В ходе исследования оценили влияние пола и возраста на радиочувствительность Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критерии формирования групп доноров для исследований. Цитогенетические исследования, результаты которых приводятся в данной работе, в УНПЦ РМ выполнялись в течение нескольких лет среди лиц, подвергшихся хроническому облучению на Южном Урале в результате аварийных сбросов жидких радиоактивных отходов с ПО “Маяк” в р. Теча с 1948 г. по 1956 гг. Облучение населения было кумулятивным: внешним за счет γ -облучения от речной воды и внутренним β -облучением за счет поступления с питьевой водой и пищей радионуклидов $^{89,90}\text{Sr}$ [12]. Диапазон кумулятивных доз облучения красного костного мозга (ККМ) обследованных людей составил от 0.003 до 4.6 Гр. Индивидуальные дозы облучения для жителей прибрежных сел р. Теча были рассчитаны в биофизической лаборатории УНПЦ РМ с применением обновленной дозиметрической системы TRDS-2016 [13].

Цитогенетическое исследование было проведено для лиц до 1960 г. рождения, обоого пола, преимущественно трех национальностей (русские, татары, башкиры), проживавших в прибрежных селах р. Теча. Из выборки были исключены лица, имеющие в анамнезе аутоиммунные, онкологические, хронические воспалительные заболевания в фазе обострения, лица, принимающие цитостатики, антибиотики, а также те, кто проходил диагностическое облучение в течение 6 предшествующих месяцев до момента взятия образца крови. Информация о состоянии здоровья доноров была получена из БД “Человек” УНПЦ РМ, информация о наличии онкозаболеваемости в анамнезе у обследуемых была предоставлена сотрудниками эпидемиологической лаборатории УНПЦ РМ. В соответствии с действующими международными нормами (Хельсинкская декла-

рация 1964 г.) и с разрешения этического комитета УНПЦ РМ у всех пациентов было получено информированное согласие на забор образцов крови и на дальнейшие исследования.

Приготовление препаратов метафазных хромосом для оценки частоты нестабильных хромосомных aberrаций. Для оценки частоты НХА обменного типа (дицентрические и кольцевые хромосомы, ацентрические кольца) готовили препараты метафазных хромосом из Т-лимфоцитов периферической крови доноров согласно протоколу, представленному в работе [2]. Протокол включает четыре последовательных этапа: культивирование клеток до стадии метафазы, гипотоническую обработку метафазных клеток, фиксацию метафазных пластинок и собственно приготовление препаратов хромосом. Кровь объемом 5 мл забирали из локтевой вены утром натощак в шприцы с гепарином. Культивирование Т-клеток проводили в стерильных бакпечатках. На одного донора готовили от одной до нескольких бакпечаток. Один образец культивировали без облучения в условиях *in vitro*, а остальные подвергали γ -облучению *in vitro* в дозах 0.5, 1 и 2 Гр. Дополнительное облучение проводили на установке Игур-1, мощность γ -облучения составила 0.014 Гр/с, источник облучения ^{137}Cs , неравномерность облучения достигала 5%.

После облучения клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37.5°C в течение 54 ч. За 3 ч до окончания культивирования в культуру вводили колцемид в итоговой концентрации 0.1 мг/мл (Панэко, Россия). Фиксировали клетки 3-кратно, холодным 4°C свежеприготовленным фиксатором (3 части спирта этилового : 1 часть леяной уксусной кислоты). Для получения препаратов хромосом суспензию раскапывали на охлажденные, обезжиренные стекла, которые сушили на воздухе. Качество препарата проверяли при фазово-контрастной микроскопии [14].

Окрашивали препараты 2%-ным красителем Гимза в течение 10 мин. Анализ проводили при световой микроскопии, при 1000-кратном увеличении на микроскопе AxioImagerZ2 (Carl Zeiss, Германия). На одного человека анализировали от 100 до 500 клеток.

В итоге по результатам исследования НХА было сформировано четыре группы доноров в зависимости от дозы облучения образцов *in vitro* (рис. 1):

1) группа “исходный уровень” – культуру крови доноров не облучали в условиях *in vitro*, но Т-клетки подверглись воздействию в условиях *in vivo* в результате хронического облучения жителей прибрежных сел р. Теча. Это самая многочисленная группа, представленная в данной работе (533 обследованных);

2) группа “0.5 Гр” – культуру крови доноров дополнительно облучали *in vitro* в дозе 0.5 Гр. Это

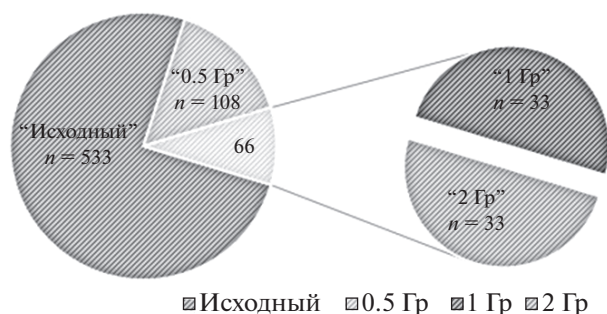


Рис. 1. Количество обследуемых групп и их пересечения (подробные объяснения даны в тексте).

была вторая группа по величине в данной работе (108 человек);

3) группа “1 Гр” – культуру крови доноров дополнительно облучали *in vitro* в дозе 1 Гр;

4) группа “2 Гр” – культуру крови доноров дополнительно облучали *in vitro* в дозе 2 Гр.

Высокодозовые группы лиц “1 Гр” и “2 Гр” были представлены одними и теми же донорами, т.е. пересекались полностью (включают по 33 человека в каждой группе). Для всех доноров, кто входил в группы “0.5 Гр”, “1 Гр”, “2 Гр” оценивали исходный уровень НХА, т.е. эти группы полностью пересекались с группой доноров “исходный уровень”.

Приготовление препаратов цитокинез-блокированных лимфоцитов. Протокол методики микроядерного теста состоял из нескольких этапов: культивирование Т-лимфоцитов периферической крови, блокирование цитокинеза, гипотоническая обработка, фиксация суспензии клеток, а затем приготовление препаратов [15].

Для исследования использовали образцы цельной крови, взятой из локтевой вены в шприц с гепарином. Приготовление рабочих растворов и постановка культуры клеток выполнялись в стерильных условиях. Для каждого образца крови готовили два культуральных флакона. Флаконы инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C и концентрации CO_2 5%. Через 29 ч от начала инкубации вторую пробу подвергали γ -облучению в дозе 1 Гр *in vitro*. Пробы облучали на установке ИГУР-1. Через 48 ч от начала инкубации в пробы добавляли 70 мкл рабочего раствора цитохалазина Б в DMSO. Через 72 ч от начала инкубации пробы подвергались гипотонической обработке раствором KCl (0.125 M) и фиксации смесью этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Далее из зафиксированной клеточной суспензии готовили препараты, которые после высыхания окрашивали 2%-ным красителем Романовского–Гимза в течение 2 ч.

Оценку клеток с микроядрами проводили при световой микроскопии 10×100 на микроскопе AxioImager (Германия). Оценивали количество двухъядерных лимфоцитов с микроядрами на 1000 двухъядерных лимфоцитов.

Для исследования микроядерным тестом было сформировано две группы доноров:

1) группа “исходный уровень” – культуру крови доноров не облучали в условиях *in vitro*, но Т-лимфоциты подвергались хроническому облучению;

2) группа “1 Гр” – культуру крови доноров дополнительно облучали *in vitro* в дозе 1 Гр.

Для всех доноров из группы “1 Гр” оценивали исходный уровень клеток с микроядрами, т.е. группы перекрывались по донорам. Группа “исходный уровень” была представлена 633 донорами, а группа “1 Гр” – 497 донорами.

Критерии отбора радиочувствительных лиц. В данном исследовании радиочувствительными донорами назывались лица, у которых наблюдался повышенный цитогенетический клеточный ответ на радиационное воздействие. Как показал анализ распределений цитогенетических данных, представленных в настоящей работе, совокупности не подчинялись нормальному распределению, что соответствует данным литературы. К радиочувствительным донорам относили тех людей, показатели которых превышали 90-й перцентиль [16]. В каждой представленной выборке анализировали влияние дозы хронического облучения на КKM на показатели радиочувствительности. Также оценивали влияние пола и возраста на момент обследования на повышенный уровень цитогенетических нарушений. Для тех доноров, которые были представлены в разных дозовых группах, оценивали воспроизводимость радиочувствительности Т-клеток при разных дозах облучения.

Статистическую обработку данных проводили с применением программы SigmaPlot, для сравнения двух выборок данных использовали непараметрический ранговый критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты исследования частоты НХА в обследованных группах. В группе “исходный уровень” среди 533 обследованных было выявлено 5.25% радиочувствительных лиц. Возраст доноров располагался в ряду от 49 до 89 лет, диапазон облучения КKM у них составил от 0.01 до 2.6 Гр, у женщин в 2 раза чаще выявлялись клетки с повышенными уровнями НХА.

В группе “0.5 Гр” повышенный уровень хромосомных aberrаций наблюдался чаще у женщин (9 и 2 соответственно), возраст этих доноров варьировал от 56 до 76 лет, индивидуальные дозы

Таблица 1. Частота обменных нестабильных aberrаций ($M \pm SD$) и показатели радиочувствительности в подгруппах обследованных лиц

Показатели	“Исходный уровень” $n = 533$	“0.5 Гр” $n = 108$	“1 Гр” $n = 33$	“2 Гр” $n = 33$
Обменные aberrации на 100 клеток ($M \pm SD$)	0.23 ± 0.57	0.44 ± 0.66	12.97 ± 4.76	49.45 ± 17.96
90%	1.00	1.05	18.00	61.2
Количество радиочувствительных доноров	28 (5.2%)	11 (10.2%)	3 (9.1%)	4 (12.1%)
пол	19 жен : 9 муж	9 жен : 2 муж	1 жен : 2 муж	3 жен : 1 муж
возраст	49–89 лет	56–76 лет	60–79 лет	57–82 года
дозы на ККМ, Гр	0.01–2.60	0.05–1.43	0.007–1.71	0.007–1.38

Примечание. n – число доноров.

Таблица 2. Частота клеток с микроядрами ($M \pm SD$) и показатели радиочувствительности у обследованных женщин

Показатели	“Исходный уровень” $n = 388$ (61.3)	“1 Гр” $n = 294$
($M \pm SD$), ‰	18.83 ± 11.21	151.02 ± 44.76
90%	30	206.5
Количество радиочувствительных доноров	37 (9.5%)	29 (9.8%)
возраст	51–88 лет	54–79 лет
дозы на ККМ, Гр	0.01–2.78	0.06–1.96

Примечание. n – число доноров, в скобках – процент от общего числа обследованных лиц.

хронического облучения на ККМ располагались в ряду от 0.05 до 1.43 Гр.

Поскольку группы “исходный уровень” и “0.5 Гр” были самые многочисленные, предполагалось, что в этих группах будет выявлена наибольшая воспроизводимость повышения частоты маркеров облучения у одних и тех же лиц. Однако только у одной женщины 73 лет с дозой на ККМ, равной 0.75 Гр, выявили повышенные уровни НХА в группе “исходный уровень” и в группе “0.5 Гр”. Таким образом, остальные лица, имевшие уровень НХА выше 90-го перцентиля в группе “0.5 Гр”, не имели таких же высоких значений НХА в группе “исходный уровень”.

В группе “1 Гр” повышенные уровни хромосомных обменов выявили у трех человек (одна женщина и двое мужчин). Это были доноры в возрасте 60, 70 и 79 лет на момент обследования. Дозы на ККМ у них располагались в ряду от 0.007 до 1.71 Гр. В группе “2 Гр” было выявлено четыре радиочувствительных донора (три женщины и один мужчина). Возрастной интервал был также широкий – от 57 до 82 лет и дозы облучения были от 0.007 до 1.39 Гр. Несмотря на то, что последние две группы полностью перекрывались по дозам, эффект радиочувствительности был обнару-

жен у разных обследуемых лиц. И эти люди не относились к радиочувствительным лицам при оценке исходного уровня НХА.

При анализе частоты Т-клеток с микроядрами выявили достоверные различия показателей в зависимости от пола. Поэтому цитогенетические данные далее представлены отдельно для мужчин и для женщин (табл. 2 и 3).

Как видно из табл. 2, исходный уровень частоты лимфоцитов с МЯ из 388 образцов показатель в 30‰ был превышен у 37 женщин, что составило 9.5% обследованных. Возрастной диапазон радиочувствительных женщин располагался в ряду от 51 года до 88 лет, дозы на ККМ – в широком интервале от 0.01 до 2.78 Гр.

При оценке радиочувствительности лимфоцитов доноров в дозовой группе “1 Гр” из 294 обследованных образцов частота лимфоцитов с МЯ превысила 206.5‰ у 29 женщин, что составило 9.8% обследованных. Возрастной диапазон обследуемых лиц располагался в ряду от 54 до 79 лет.

Радиочувствительными донорами, у которых значения частоты клеток с микроядрами превысили 90-й перцентиль и в группе “исходный уровень” и в группе “1 Гр”, были три женщины. Их возраст составил 65, 66 и 67 лет, дозы на ККМ –

Таблица 3. Частота клеток с микроядрами ($M \pm SD$) и показатели радиочувствительности у обследованных мужчин

Показатели	“Исходный уровень” $n = 245$ (38.7)	“1 Гр” $n = 203$
($M \pm SD$), ‰	14.41 ± 8.01	135.19 ± 37.1
90%	26.3	183.4
Количество радиочувствительных доноров	24 (9.8%)	20 (9.8%)
возраст	54–84 лет	55–73 лет
дозы на ККМ, Гр	0.01–1.46	0.08–1.53

Примечание. n – число доноров (% от общего числа обследованных лиц).

1.26, 1.29 и 1.96 Гр, т.е. это были женщины, у которых дозы хронического облучения на ККМ превысили 1 Гр.

Как видно из табл. 3, исходный уровень частоты лимфоцитов с МЯ из 245 образцов значение в 26.3‰ было превышено у 24 мужчин, что составило 9.8% от всей выборки. Возраст радиочувствительных мужчин находился в ряду от 54 до 84 лет, дозы на ККМ у них располагались в широком интервале – от 0.01 до 1.46 Гр.

При оценке радиочувствительности лимфоцитов доноров в дозовой группе “1 Гр” из 203 обследованных образцов частота лимфоцитов с МЯ превысила 183.4‰ у 20 мужчин, что составило 9.8% обследованных. Их возраст располагался в ряду от 55 до 73 лет. Диапазон доз на ККМ у этих лиц составил 0.08–1.53 Гр.

Радиочувствительными донорами, у которых значения частоты клеток с микроядрами превысили 90-й перцентиль в группе “исходный уровень” и “1 Гр”, были семь мужчин. Их возраст составил 58, 63, 63, 65, 68, 73 и 73 лет, дозы на ККМ были равны – 0.77, 0.93, 1.17, 0.14, 0.18, 1.01 и 1.24 Гр.

Таким образом, в ходе цитогенетического исследования, проведенного двумя методами в условиях *in vitro* γ -облучения среди населения Южного Урала, подвергшегося хроническому радиационному воздействию, выявили превышение цитогенетических показателей у небольшой части обследованной выборки (около 10%). Не было отмечено влияния дозы на ККМ хронического аварийного облучения на радиочувствительность Т-клеток, поскольку превышение повреждений ДНК в ФГА-стимулированных лимфоцитах наблюдалось у доноров как с низкими, так и с высокими дозами на ККМ (от 0.007 до 2.78 Гр). Высокие уровни НХА чаще выявляли у женщин, однако микроядерный тест влияния пола не выявил. Не обнаружили также влияния возраста на радиочувствительность Т-клеток у лиц в исследуемом возрастном диапазоне (48–89 лет). По уровню хромосомных aberrаций отметили повышенные значения в группе “исходный уровень” и “0.5 Гр” только у одной женщины. А по методу микро-

ядерного теста у 3 женщин и 7 мужчин (1 и 3.4% доноров соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос о радиочувствительности организма достаточно непростой, поскольку организм – сложная система и включает много элементов и связей между ними. В классической радиобиологии принято оценивать радиочувствительность на основе выживания клеточных культур или в экспериментах на животных [4].

Данные других исследователей и результаты, представленные в нашей работе, говорят в пользу того, что однозначно оценивать “радиочувствительность” всего организма на основе известных “клеточных” подходов пока не представляется возможным. Сложно устроенная многоуровневая система с огромным количеством регуляторных связей и механизмов (что представляет из себя организм человека) может модифицировать радиобиологический ответ и проявить иную реакцию на облучение в отличие от клеточной культуры при облучении *in vitro*. Так, в ходе исследования продуктов генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла (TP53, CHK2, MDM2, NBS1, BRCA1, RAD17, ATM), было отмечено, что недостаточное количество или отсутствие ферментов, регулирующих определенные стадии клеточного цикла, приводит к увеличению частоты мутирования и геномной нестабильности клеток [17].

Радиочувствительность организма может быть выявлена как при воздействии малых, так и высоких доз ионизирующего излучения, что косвенно подтверждают и данные, полученные в настоящем исследовании. Очень важно, что при использовании двух цитогенетических методов (метод простого окрашивания метафазных хромосом и микроядерный тест) были получены сходные результаты относительно влияния аварийного хронического облучения на радиочувствительность Т-клеток обследованных лиц. В ходе анализа данных было отмечено, что радиочувствительность во всех группах доноров выявлялась и при малых дозах на ККМ (0.007 Гр) и при высоких до-

зах на ККМ (до 2.78 Гр). Таким образом, в данной работе не было выявлено влияния дозы хронического облучения ККМ на проявление радиочувствительности ФГА-стимулированных Т-лимфоцитов.

Считается, что при малых дозах существенную роль играют “немишенные эффекты”, что приводит к большему эффекту от воздействия за счет увеличения объема ткани, вовлеченной в ответ, и не наблюдается зависимости эффектов от дозы. Существует предположение, что именно механизмы, лежащие в основе этих эффектов, влияют на индивидуальное разнообразие при радиобиологическом ответе. В работе [18] убедительно показано, что в передаче сигналов от поврежденной радиацией клетки к соседним необлученным клеткам задействованы межклеточные щелевые каналы и секреция растворимых факторов в межклеточное пространство, где активная роль принадлежит экзосомам. Отмечено, что даже при малых дозах повреждений от облучения больше, чем изначальный объем ткани, подвергшейся радиационному воздействию.

Важно отметить, что в настоящей работе радиочувствительными были клетки от 5 до 12% обследованных во всех группах, что может доказывать существенное влияние особенностей генома на радиочувствительность. Так, структурные особенности хроматина, генов (ОНП, мутации) способны модифицировать клеточный радиобиологический ответ: вызывать повышенный уровень хромосомных aberrаций; усиливать или подавлять экспрессию отдельных генов; изменять интенсивность биохимических реакций и их каскадов и т.д. [19]. Влияние генетического фактора на вариацию радиобиологического ответа доказывает наличие редких синдромов у человека, которые предполагают высокую радиочувствительность при воздействии ионизирующего излучения (например: атаксия телеангиэктазия, синдром Ли Фраумени, анемия Фанкони, синдром поврежденный хромосом Неймегена (NBS), синдром Корнелии де Ланге и т.д.) [7]. При таких синдромах фракция выживших клеток при облучении 2 Гр (SF2) составляет от 10 до 50% и увеличивается в 1.5–2 раза выход индуцированных хромосомных aberrаций. Гомозиготные носители мутаций генов *LIG4* или *ATM*, когда SF2 составляет всего 1%, хорошо поддаются лучевой терапии и для них уместно применить термин “гиперрадиочувствительность” [20, 21].

Наиболее хорошо исследована радиочувствительность у лиц, прошедших лучевую терапию. При наблюдении этих людей отмечались различные по степени тяжести поражения тканей и широкая вариабельность повреждений хромосом. Полиморфизмом гена *GSTP1* можно было объяс-

нить ~35% изменчивости реакции на радиотерапию [22, 23].

Для 99 человек изучалась сопряженность частоты γ -индуцированных (1 Гр *in vitro*) aberrаций хромосом с полиморфизмом 45 кандидатных генов репарации, детоксикации ксенобиотиков и оксидативного стресса (всего было изучено 53 сайта). В ходе исследования была обнаружена сопряженность уровней aberrаций хромосомного типа с носительством минорных аллелей полиморфных сайтов генов *OGG1 Ser326Cys*, *ABCB1 Ile1145* и *NQO1 Pro187Ser* ($p = 0.0002$). Совместное использование генетических и цитогенетических предикторов позволило объяснить более 30% популяционной изменчивости радиочувствительности хромосом [24].

Широкая вариабельность цитогенетических показателей отмечалась и в настоящем исследовании даже при высоких дозах облучения *in vitro*. Так, частота НХА в группе “1 Гр” варьировала от 5 до 24 на 100 клеток, а в группе “2 Гр” — от 18 до 104 на 100 клеток. Частота клеток с микроядрами в группе “1 Гр” варьировала от 30 до 336‰.

Известно, что к факторам, моделирующим радиобиологический ответ, относятся возраст, курение, наличие диабета и васкулярные заболевания, связанные с коллагеном. Данные относительно влияния на этот показатель пола, этнической принадлежности, диеты, алкоголя и других привычек либо отсутствуют, либо противоречивы [25]. В нашем исследовании установить влияние возраста на радиочувствительность Т-лимфоцитов не удалось. Анализ данных показал, что повышенный уровень повреждений ДНК отмечали у лиц разного возраста в широком диапазоне — от 49 до 89 лет.

Что касается воспроизводимой повышенной радиочувствительности Т-клеток, то при оценке частоты НХА отметили только одну женщину (менее 1% выборки) у которой в “исходном уровне” и при “0.5 Гр” была обнаружена повышенная частота хромосомных обменов. Вопреки нашим ожиданиям, у радиочувствительных доноров в группе “1 Гр” и “2 Гр” не было отмечено такого же результата в “исходном уровне”. При использовании микроядерного теста воспроизводимую радиочувствительность клеток отметили у большего количества обследованных людей (три женщины и семь мужчин).

В представленном нами анализе цитогенетических данных, как в любом исследовании, есть неточности, которые могли повлиять на результаты. К ним можно отнести разное количество клеток (от 100 до 500) при анализе метафазных пластинок, малое число доноров в высокодозовых группах, ошибки оценок индивидуальных доз облучения ККМ, которые могут в некоторых случаях составлять до 30%. Однако выводы, которые

сделаны на основании проведенного анализа, соответствуют опубликованным литературным данным, представленным нами выше.

Таким образом, мы считаем, что наши результаты позволяют заключить следующее:

необходимо с осторожностью делать выводы об индивидуальной реакции всего организма на облучение на основе клеточных методик, проведенных в условиях *in vitro*;

индивидуальная радиочувствительность организма примерно у 10% обследованных будет существенно влиять на результаты индивидуальной биодозиметрии. Это необходимо учитывать при подготовке экспертных заключений о наличии факта воздействия облучения на человека, а также при трактовке значении доз аварийного облучения в клинической практике.

Авторы выражают благодарность И.А. Чикиревой и З.И. Сыченко за техническое сопровождение работы.

Работа была поддержана Федеральным медико-биологическим агентством России.

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. *Di Giorgio M., Sard M., Busto E. et al.* Assessment of individual radiosensitivity in human lymphocytes using micronucleus and microgel electrophoresis "Comet" assays // Presentado en: 11th International Congress on the International Radiation Protection Association. Madrid, España, 23–28 mayo 2004.
2. IAEA. International Atomic Energy Agency Technical Reports Series № 405. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: A Manual. 2011. P. 30–45.
3. *Awa A.* Persistent chromosome aberrations in the somatic cells of A-bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki // *Radiat. Res.* 1991 (Suppl. 1). P. 265–274. https://doi.org/10.1269/jrr.32.Suppl_1.265
4. Отчет МКРЗ по тканевым реакциям, ранним и отдаленным эффектам в нормальных тканях и органах — пороговые дозы для тканевых реакций в контексте радиационной защиты / Под ред. Аклеева А.В., Киселева М.Ф. Челябинск: Книга, 2012. 384 с. (Труды МКРЗ; публикация 118)
5. *Le Guen B.* Views on emerging scientific and societal issues in Radiological Protection Individual radiosensitivity and screening tests in the workplace // Workshop on Science and Values in Radiological Protection. Helsinki, Finland, 15–17 January 2008. <https://inis.iaea.org>.
6. Workshop on Science and Values in Radiological Protection. Helsinki, Finland, 15–17 January 2008. <https://inis.iaea.org>.
7. *Foray N., Colin C., Bourguignon* 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence // *Radiology.* 2012. V. 264. P. 627–631.
8. *Franco N., Lamartine J., Frouin V. et al.* Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes // *Radiat. Res.* 2005. V. 163. P. 623–635. <https://doi.org/10.1667/RR3391>
9. *Morgan W., Sowa M.* Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 40. P. 14127–14128. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507119102>
10. *Рубанович А.В., Хромов-Борисов Н.Н.* Оценки генетических рисков при совместном действии генов: критический обзор // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 7. С. 865–878. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070079>
11. *Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Веснина И.Н. и др.* Анализ генотипической зависимости частот хромосомных аберраций в лимфоцитах человека при облучении *in vivo* и *in vitro* // *Радиационная биология. Радиационная экология.* 2010. Т. 50. № 3. С. 340–344.
12. Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча // Под ред. Аклеева А.В., Киселева М.Ф. М.: Медбиоэкстрем, 2001. 532 с.
13. *Degteva M.O., Shagina N.B., Tolstykh E.I. et al.* Calculations of individual dose from environmental exposures on the Techa river and EURT using TRDS-2016 for members of the TRC members. Urals Research Center for Radiation Medicine and Pacific Northwest National Laboratory. 2017 // Final Report for Milestone 13, Part 1. April 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.08.013>
14. *Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., Akleyev A.V.* Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure // *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environmen. Mutagen.* 2013. V. 756. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.016>
15. *Ахмадуллина Ю.П.* Радиочувствительность Т-лимфоцитов периферической крови у потомков первого поколения, отцы которых подверглись хроническому радиационному воздействию: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2014.
16. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика McGraw-Hill, 1994. М.: Практика, 1998. 459 с.
17. *Xu B., Kim S., Lim D., Kastan M.G.* Two molecularly distinct G2/M checkpoints are induced by ionizing irradiation // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 4. P. 1049–1059. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1049-1059.2002>
18. *Le M., Fernandez-Palomo C., McNeill F.E. et al.* Exosomes are released by bystander cells exposed to radia-

- tion-induced biophoton signals: Reconciling the mechanisms mediating the bystander effect // *PLoS One*. 2017. V. 12(3). P. e0173685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173685>
19. *Gorbunova V., Seluanov A.* DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection // *Mut. Res.* 2016. V. 788. P. 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.004>
 20. *Gately D.P., Hittle G.S., Chan K.T., Yen T.J.* Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity // *Mol. Biol. Cell*. 1998. V. 9. P. 2361–2374.
 21. *Хандогина Е.К.* Изучение генетического контроля радиочувствительности // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 3. С. 293–301.
 22. *Karahalil B., Sardas S., Kocabas N. et al.* Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the *GSTM1* genotype // *Mut. Res.* 2002. P. 515. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00003-7)
 23. *Marcona F., Andreoli C., Rossi S. et al.* Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population // *Mut. Res.* 2003. V. 541. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00171-2)
 24. *Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Белопольская О.Б., Рубанович А.В.* Генетические и цитогенетические предикторы радиочувствительности хромосом человека // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013. Т. 53. № 3. С. 259–266. <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-2-46-61>
 25. *Bouffler S.* Evidence for variation in human radiosensitivity: potential impact on radiological protection 22 October 2015 ICRP Symposium 2015, Seoul, South Korea. <https://doi.org/10.1177/0146645315623158>

Study of the Individual Radiosensitivity in Man Based on the Assessment of the Frequency of Chromosome Aberrations and Micronuclei in Peripheral Blood T-Lymphocytes

A. V. Vozilova^{a,*} and Yu. R. Akhmadullina^{a,b}

^a*Ural Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454076 Russia*

^b*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia*

*e-mail: vozilova@urcrm.ru

In the modern world the influence of low-dose ionizing radiation on a human being is increasing (medical diagnostics, etc.). The issue of the low dose effect on human health is important but rather controversial. It is known that up to 15% of the population react to radiation exposure differently from what has been expected, which, according to the published data, happens due to their genome peculiarities. The objective of the current study was to investigate the influence of the chronic low dose-rate exposure (doses to red bone marrow varied within the range 3–4600 mGy) on the radiosensitivity of T-cells *in vivo* and *in vitro* under additional gamma-exposure of peripheral blood T-lymphocytes (0.5, 1, and 2 Gy). Cytogenetic parameters—frequency of unstable chromosome aberrations and micronuclei—were used as exposure markers. People were considered radiosensitive if the obtained values of the parameters for them exceeded “mean+2SD.” Based on the findings of the performed study the following conclusions have been drawn: the number of donors with increased cytogenetic parameters did not exceed 10%; increased radiosensitivity was observed in donors with both low and high doses of chronic exposure (from 0.01 to 2.78 Gy). No age dependence of radiosensitivity in the study age range of the donors was revealed (49–89 years). It was found out that one and the same donor was radiosensitive in case of one exposure mode and at the same time showed no radiosensitivity in case of a different exposure mode.

Keywords: individual radiosensitivity, micronucleus test, chromosome aberrations, peripheral blood lymphocytes.