

УДК 612.1

Применение методов системного анализа в оценке цитогенетических показателей у ликвидаторов последствий радиационных аварий

А.Г. Карапетян

*Национальный ожоговый центр МЗ РА
0054, Ереван, Давидашен, п/я 25*

Ключевые слова: ликвидаторы аварии, ионизирующее излучение, хромосомные aberrации, полиплоидные клетки

Известно, что главным инициирующим событием после облучения организма является повреждение ДНК, на основании которого одним из первых и прямых признаков воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на клетку рассматривается дестабилизация хромосом [9,11]. Возникает радиационно-индуцируемая нестабильность генома (РИНГ), с которой связаны практически все главные отдаленные последствия ИИ – мутагенез, канцерогенез, старение [4,8]. Нестабильность генома является важным фактором как для биологической индикации лучевых повреждений, так и для прогнозирования развития отдаленных неблагоприятных эффектов воздействия ИИ. Ни хромосомные aberrации, ни проявление генных мутаций не имеют прямого влияния на здоровье человека, а указывают на вероятность нанесенного вреда организму, который будет обнаружен в будущем.

Классический хромосомный анализ лимфоцитов крови человека в настоящее время остается одним из доступных и широко применяемых методов оценки хромосомной нестабильности у облученных популяций человека. Хромосомные aberrации (ХА) в лимфоцитах периферической крови являются индивидуальным биологическим дозиметром при остром облучении [5]. Как экспериментальные исследования, так и клинические данные свидетельствуют о наличии повышенной частоты ХА даже в отдаленные сроки после облучения. Характер структурных перестроек, их частота зависят от вида ИИ [6,7].

Материал и методы

В настоящей статье анализируются данные многолетних наблюдений за состоянием хромосомного аппарата соматических клеток (лимфо-

циты периферической крови) у ликвидаторов последствий радиационных аварий (было обследовано более 350 ликвидаторов, проанализировано более 55 000 метафаз). Цитогенетическое обследование включало анализ хромосом с окраской Гимза, рекомендованной МАГАТЭ [10], с некоторыми модификациями, принятыми в лаборатории радиационной цитогенетики НОЦ МЗ РА, которые связаны с оценкой митотического индекса (количество митозов на 1000 клеток). Стимуляция лимфоцитов к делению (лимфоциты в крови находятся на стадии интерфазы) имеет свои индивидуальные колебания, которые могут зависеть от состояния организма (болезнь или воздействие внешних факторов). Поэтому за единицу пролиферативной активности ФГА-стимулированных лимфоцитов взято количество метафаз на 0,5мл культуральной суспензии, полученной после обработки 1,2мл цельной крови (причем в анализ брались хромосомные пластинки строго на стадии метафазы клеточного деления – степень спирализации хромосом не менее 20%).

Статистический анализ данных проводился с помощью ряда компьютерных программ, предназначенных для статистической обработки массивов цифровых данных. Использованы электронная таблица Microsoft Excel и специализированные статистические пакеты Statsoft-7, SPSS-10.0, MedCalc и StatGraphics Plus [2,3].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что хромосомный аппарат лимфоцитов периферической крови у ликвидаторов существенно пострадал. Необходимо указать, что эти изменения также зависят от времени, прошедшего после облучения (давности события). Начиная с 1987г. уровень частоты ХА более чем в 2-2,5 раза превышал спонтанный уровень. В дальнейшем отмечен некоторый спад, после чего опять наблюдался рост цитогенетических показателей и в 1994 г. разница с контролем увеличилась в 6-7 раз, а к 2005-2006гг. среднее количество хромосомных aberrаций достигло $15,34 \pm 2,52$. Динамика средних значений хромосомных aberrаций по годам представлена на рис. 1.

При статистическом анализе данных по ХА нами было обнаружено, что из применяемых в настоящее время моделей для описания динамики изменения ХА и для прогноза наиболее подходит логарифмическая: $y = 0,3161 + 9,8469 \lg(x)$, где x – временной интервал (годы), пройденный после аварии на ЧАЭС, а y – уровень ХА. Эта формула позволяет не только получить прогноз при экстраполяции (повышение уровня ХА на протяжении ближайших лет), но и интерполируя, получить теоретическую часть кривой, которая характеризует уровень ХА на протяжении нескольких лет, когда не проводились исследования.



Рис. 1. Изменение среднего количества хромосомных aberrаций в динамике

По типам aberrаций в основном регистрировались хроматидные и хромосомные (одиночные и двойные разрывы ДНК), а начиная с 1995 г. были зафиксированы обменные aberrации. На рис. 2 представлена динамика хроматидных изменений со среднеквадратичным отклонением в точках, соответствующих году исследования.

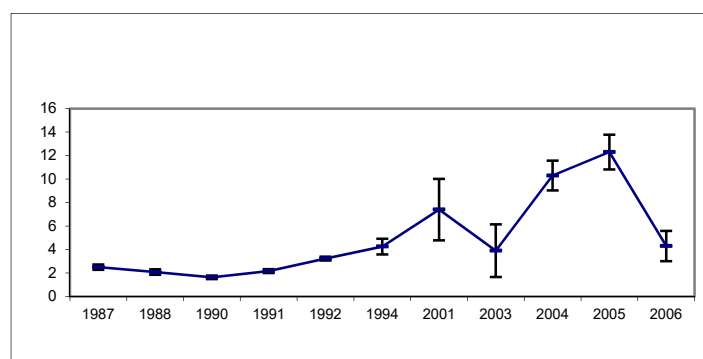


Рис. 2. Динамика хроматидных изменений (одиночных разрывов) лимфоцитов у ликвидаторов ЧАЭС

Динамика изменения количества одиночных разрывов описана формулой регрессии: $y=1.5277+0.291x$, согласно которой прогнозируется увеличение этого показателя на протяжении ближайших лет. Здесь y – количество одиночных разрывов, а x – количество лет, пройденных со дня аварии. 95% доверительный уровень регрессии охватывает 82,7% эмпирических значений этого показателя.

Не менее информативным показателем является показатель – хромосомные изменения – двойные разрывы. Динамика изменения количества двойных разрывов (рис. 3) была описана нами формулой $y=1.939+0.138x$, где x – количество лет, пройденных после аварии на ЧАЭС, а y – количество двойных разрывов.

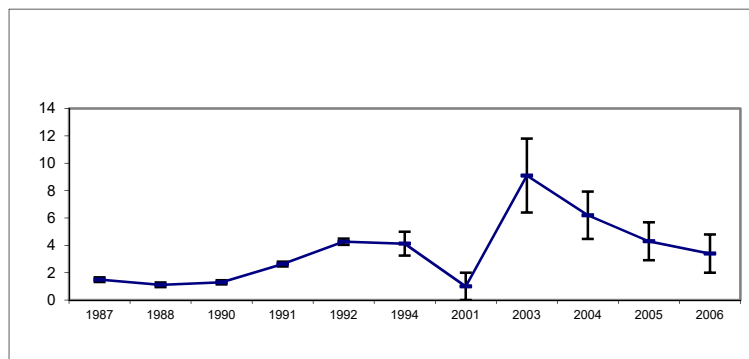


Рис. 3. Динамика хромосомных изменений (двойных разрывов) лимфоцитов у ликвидаторов ЧАЭС

Мы попытались также выявить мультирегрессионную взаимосвязь и ее изменение в ранние и отдаленные периоды наблюдения (1987 – 2006гг.) между количеством одинарных, двойных разрывов и хромосомными абберациями. Оказалось, что увеличение количества разрывов соотносимо с увеличением уровня хромосомных аббераций, поэтому, несмотря на увеличение их количества на протяжении 20 лет, их взаимосвязь претерпевает незначительное изменение (наблюдалось понижение свободного коэффициента в 2,77 раза в отдаленном периоде относительно раннего периода).

Увеличение обменных аббераций (маркерных хромосом) является одним из возможных механизмов устранения генетических нарушений в клетке, которая не проходит очередной митоз, вследствие чего не образуются дочерние клетки, то есть ХА элиминируют.

У ликвидаторов считающиеся биомаркерами ИИ дицентрики и кольца не были обнаружены. Это объясняется двумя причинами:

- клетки с указанными биомаркерами быстро элиминируют (а исследования были начаты через год после облучения),
- ликвидаторы получили дозы менее 1Гр (группа авторов [1] считает, что дицентрики и кольца образуются при действии дозы облучения более 1-1,5Гр).

Важный момент в исследованиях – обнаружение полиплоидных клеток в основном тетраплоидных ($2n = 92$). В обследованиях до 1990 года полиплоидные формы лимфоцитов регистрировались эпизодически. В дальнейшем было зарегистрировано существенное увеличение полиплоидных клеток. С позиций нестабильности генома перестройки хроматина оцениваются как адаптационный процесс с целью устранения генетических нарушений в клетке, а изменение пloidности – один из возможных механизмов.

Хотя обнаруженное изменение плоидности клеток имеет волнообразный характер, оно является специфичным для действия ИИ. На рис. 4 приведена динамика изменения количества полиплоидных клеток, которая описана уравнением регрессии $y=0,4912+0,0152x$, согласно которому ожидается дальнейшее повышение количества полиплоидных клеток в отдаленном периоде. В полученных уравнениях x – количество лет, пройденных после аварии на ЧАЭС, а y – количество полиплоидных клеток.



Рис. 4. Динамика изменений количества полиплоидных клеток (4n) у ликвидаторов ЧАЭС

Нужно отметить важное значение обнаруженного роста полиплоидных клеток, как возможного цитогенетического маркера в облученном организме. Не вызывает сомнений, что участие в аварийных работах индуцировало сохраняющиеся повреждения генома.

Правдивость наших прогнозов и теоретических кривых цитогенетических показателей, полученных нами, подтверждает сравнение результатов исследований лиц, участвовавших в ликвидации ЧАЭС и в другой радиационной аварии – на ПО «МАЯК», прошедшей в 1957 году. Исследование цитогенетических нарушений у них производилось спустя более чем 40 лет. Средние значения основных цитогенетических показателей к этому времени у ликвидаторов последствий аварии на ПО «МАЯК» составили: пролиферативная активность $105,5 \pm 17,23$; хромосомные aberrации $21,4 \pm 2,1$, а количество полиплоидных клеток $0,41 \pm 0,17$.

Обобщая результаты цитогенетических исследований у армянских ликвидаторов последствий радиационных аварий, однозначно можно констатировать, что нестабильность генома лимфоцитов периферической крови является довольно выраженной и, хотя в отдаленном периоде наблюдается тенденция к некоторой нормализации показателей (хромосомные aberrации и пролиферативная активность), тем не менее, эти показатели достоверно отличаются от контрольной группы.

Применение регрессионных и мультирегрессионных методов ана-

лиза данных дало возможность разработать уравнения, позволившие не только дать прогноз изменений цитогенетических показателей (по всем показателям ожидается дальнейший рост их уровня), но и составить представление об их изменении в среднем постчернобыльском периоде, когда эти показатели не исследовались.

Поступила 02.06.20

Համակարգային վերլուծության մեթոդների կիրառումը ճառագայթային վթարների հետևանքների լիկվիդատորների բջջագենետիկական ցուցանիշների գնահատման գործում

Ա.Գ. Կարապետյան

Գենոմի անկայունությունը կարևոր գործոն է ինչպես ճառագայթային վնասվածքների կենսաբանական գնահատման, այնպես էլ իոնացնող ճառագայթների երկարաժամկետ անբարենպաստ հետևանքների զարգացման կանխատեսման համար:

Ամփոփելով ճառագայթային վթարների հետևանքների լիկվիդատորների բջջագենետիկ ուսումնասիրությունների արդյունքները՝ մենք կարող ենք հստակ փաստել, որ պերիֆերիկ արյան լիմֆոցիտների գենոմի անկայունությունը բավականին ցայտուն է, և չնայած երկարաժամկետ հեռանկարում նկատվում է ցուցանիշների որոշակի նորմալացման միտում, այնուամենայնիվ այդ ցուցանիշները զգալիորեն տարբերվում են հսկիչ խմբերից:

Տվյալների վերլուծության ռեգրեսիոն և մուլտիռեգրեսիոն մեթոդների օգտագործումը հնարավորություն տվեց ստանալու հավասարումներ, որոնք ոչ միայն կանխատեսում կտան բջջագենետիկ ցուցանիշների փոփոխությունների վերաբերյալ (բոլոր ցուցանիշների համար նրանց մակարդակի հետագա աճ է սպասվում), այլ նաև թույլ կտան գաղափար կազմել դրանց փոփոխության մասին հետազոտության միջին շրջանում, երբ այդ ցուցանիշները չեն ուսումնասիրվել:

Application of System Analysis Methods in the Evaluation of Cytogenetic Indicators of Emergency Response

A.G. Karapetyan

Genome instability is an important factor both for the biological indication of radiation injuries and for predicting the development of long-term adverse effects of ionizing radiation.

Summarizing the results of cytogenetic studies in Armenian liquidators, we can clearly state that the instability of the peripheral blood lymphocyte genome is quite pronounced and, although in the long term there is a tendency to some normalization of indicators (chromosomal aberrations and proliferative activity), nevertheless, these indicators significantly differ from the control groups.

The use of regression and multi-regression methods of data analysis made it possible to develop equations that would not only give a forecast of changes in cytogenetic indicators (a further increase in their level is expected for all indicators), but also provide an idea of their change in the average post-Chernobyl period, when these indicators were not studied.

Литература

1. *Асеева Е.А., Снигирева Г.П., Неворова А.Л. и др.* Клетки с множественными хромосомными нарушениями в группах лиц, подвергшихся облучению при различных ситуациях, и их возможная биологическая роль. Радиационная биология. Радиоэкология. 2009, т. 49, 5, с.552-562.
2. *Беребин М.А.* Применение пакета статистических программ STATGRAPHICS в психологических исследованиях. Учебное пособие, Челябинск, 2002.
3. *Вуколов Э.А.* Основы статистического анализа, М., 2004.
4. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение. Радиобиол. и радиоэкол., 2001, т.41, 3, с.272-289.
5. *Окладникова Н.Д., Скотт Б.Р., Токарская З.Б. и др.* Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2005, т.50, 6, с.23-32.
6. *Погосян А.С., Даллакян А.М., Карапетян А.Г., Оганесян А.Н., Карамян Н.С., Оганесян Н.М.* Сравнительная характеристика хромосомной нестабильности у ликвидаторов ЧАЭС и при различных заболеваниях. Գիտա-թժշկական հանդես, 2008, 4, с.45-53.
7. *Погосян А.С., Даллакян А.М.* Мониторинг цитогенетического статуса ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС и ПО "Маяк", 30 лет после Чернобыля. Медицинские последствия в Армении, Ереван, 2016, с.72-76.
8. *Пяткин Е.К., Нугис В.Ю.* Зависимость выхода aberrаций хромосом от дозы облучения лимфоцитов человека in vitro и in vivo. Мед. радиология, 1986, т. 31, 9, с.30-35.
9. *Севан'каев А.В.* Некоторые итоги цитогенетических исследований в связи с оценкой последствий Чернобыльской аварии. Радиобиол. и радиоэкол., 2000, т.40, вып.5, с.590-597.
10. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: A manual, Vienna, IAEA, 2001, Techn. Reports. Ser., N405, p.126.
11. *Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Milhailova G.F.* Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure. Applied Radiation and Isotopes, 2000, v.52, p.1149-1152.