

# **Использование цитогенетической дозиметрии для обеспечения готовности и реагирования при радиационных аварийных ситуациях**



ДАТА ОПУБЛИКОВАНИЯ: ЯНВАРЬ 2014 ГОДА



**IAEA**

Международное агентство по атомной энергии

## **НОРМЫ МАГАТЭ ПО БЕЗОПАСНОСТИ И ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ДАННОЙ ТЕМЕ**

### **НОРМЫ МАГАТЭ ПО БЕЗОПАСНОСТИ**

В соответствии со статьей III своего Устава МАГАТЭ уполномочено устанавливать или принимать нормы безопасности для защиты здоровья и сведения к минимуму опасностей для жизни и имущества и обеспечивать применение этих норм.

**Публикации, посредством которых МАГАТЭ устанавливает нормы, выпускаются в Серии норм МАГАТЭ по безопасности.** В этой серии охватываются вопросы ядерной безопасности, радиационной безопасности, безопасности перевозки и безопасности отходов. **Категории публикаций в этой серии - это Основы безопасности, Требования безопасности и Руководства по безопасности.**

Информацию о программе МАГАТЭ по нормам безопасности можно получить на сайте МАГАТЭ в Интернете

<http://www-ns.iaea.org/standards/>

На этом сайте содержатся тексты опубликованных норм безопасности и проектов норм безопасности на английском языке. Тексты норм безопасности выпускаются на арабском, испанском, китайском, русском и французском языках, там также можно найти глоссарий МАГАТЭ по вопросам безопасности и доклад о ходе работы над еще не выпущенными нормами безопасности. Для получения дополнительной информации просьба обращаться в МАГАТЭ по адресу: PO. Box 100, 1400 Vienna, Austria.

Всем пользователям норм МАГАТЭ по безопасности предлагается сообщать МАГАТЭ об опыте их использования (например, в качестве основы для национальных регулирующих положений, для составления обзоров безопасности и учебных курсов) в целях обеспечения того, чтобы они по-прежнему отвечали потребностям пользователей. Эта информация может быть направлена через сайт МАГАТЭ в Интернете или по почте (см. адрес выше), или по электронной почте по адресу [Official.Mail@iaea.org](mailto:Official.Mail@iaea.org).

### **ПУБЛИКАЦИИ ПО ДАННОЙ ТЕМЕ**

МАГАТЭ обеспечивает применение норм и в соответствии со статьями III и VIII.C своего Устава предоставляет сведения и способствует обмену информацией, касающейся мирной деятельности в ядерной области, и служит в этом посредником между своими государствами-членами.

Доклады по вопросам безопасности и защиты в ядерной деятельности выпускаются в качестве **докладов по безопасности**, в которых приводятся практические примеры и подробные описания методов, которые могут использоваться в поддержку норм безопасности.

Другие публикации МАГАТЭ по вопросам безопасности выпускаются в качестве **докладов по радиологическим оценкам, докладов ИНСАГ – Международной группы по ядерной безопасности, технических докладов** и документов серии **TECDOC**. МАГАТЭ выпускает также доклады по радиологическим авариям, учебные пособия и практические руководства, а также другие специальные публикации по вопросам безопасности.

Публикации по вопросам физической безопасности выпускаются в **Серии изданий МАГАТЭ по физической ядерной безопасности**.

**Серия изданий МАГАТЭ по ядерной энергии** состоит из информационных публикаций, предназначенных способствовать и содействовать научно-исследовательской работе в области ядерной энергии, а также развитию ядерной энергии и ее практическому применению в мирных целях. В ней публикуются доклады и руководства о состоянии технологий и успехах в их совершенствовании, об опыте, образцовой практике и практических примерах в области ядерной энергетики, ядерного топливного цикла, обращения с радиоактивными отходами и снятия с эксплуатации.

**Использование  
цитогенетической  
дозиметрии для обеспечения  
готовности и реагирования  
при радиационных  
аварийных ситуациях**

Членами Международного агентства по атомной энергии являются следующие государства:

|                      |                         |                           |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|
| АВСТРАЛИЯ            | КАМБОДЖА                | ПЕРУ                      |
| АВСТРИЯ              | КАМЕРУН                 | ПОЛЬША                    |
| АЗЕРБАЙДЖАН          | КАНАДА                  | ПОРТУГАЛИЯ                |
| АЛБАНИЯ              | КАТАР                   | РЕСПУБЛИКА МОЛДОВА        |
| АЛЖИР                | КЕНИЯ                   | РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ      |
| АНГОЛА               | КИПР                    | РУАНДА                    |
| АРГЕНТИНА            | КИТАЙ                   | РУМЫНИЯ                   |
| АРМЕНИЯ              | КОЛУМБИЯ                | САЛЬВАДОР                 |
| АФГАНИСТАН           | КОНГО                   | САН-МАРИНО                |
| БАГАМСКИЕ ОСТРОВА    | КОРЕЯ, РЕСПУБЛИКА       | САУДОВСКАЯ АРАВИЯ         |
| БАНГЛАДЕШ            | КОСТА-РИКА              | СВАЗИЛЕНД                 |
| БАХРЕЙН              | КОТ-Д'ИВУАР             | СВЯТОЙ ПРЕСТОЛ            |
| БЕЛАРУСЬ             | КУБА                    | СЕЙШЕЛЬСКИЕ ОСТРОВА       |
| БЕЛИЗ                | КУВЕЙТ                  | СЕНЕГАЛ                   |
| БЕЛЬГИЯ              | КЫРГЫЗСТАН              | СЕРБИЯ                    |
| БЕНИН                | ЛАТВИЯ                  | СИНГАПУР                  |
| БОЛГАРИЯ             | ЛАОССКАЯ НАРОДНО-       | СИРИЙСКАЯ АРАБСКАЯ        |
| БОЛИВИЯ              | ДЕМОКРАТИЧЕСКАЯ         | РЕСПУБЛИКА                |
| БОСНИЯ И ГЕРЦЕГОВИНА | РЕСПУБЛИКА              | СЛОВАКИЯ                  |
| БОТСВАНА             | ЛЕСОТО                  | СЛОВЕНИЯ                  |
| БРАЗИЛИЯ             | ЛИБЕРИЯ                 | СОЕДИНЕННОЕ КОРОЛЕВСТВО   |
| БУРКИНА-ФАСО         | ЛИВАН                   | ВЕЛИКОБРИТАНИИ И СЕВЕРНОЙ |
| БУРУНДИ              | ЛИВИЯ                   | ИРЛАНДИИ                  |
| БЫВШАЯ ЮГОСЛ. РЕСП.  | ЛИТВА                   | СОЕДИНЕННЫЕ ШТАТЫ         |
| МАКЕДОНИЯ            | ЛИХТЕНШТЕЙН             | АМЕРИКИ                   |
| ВЕНГРИЯ              | ЛЮКСЕМБУРГ              | СУДАН                     |
| ВЕНЕСУЭЛА            | МАВРИКИЙ                | СЬЕРРА-ЛЕОНЕ              |
| ВЬЕТНАМ              | МАВРИТАНИЯ              | ТАДЖИКИСТАН               |
| ГАБОН                | МАДАГАСКАР              | ТАИЛАНД                   |
| ГАИТИ                | МАЛАВИ                  | ТОГО                      |
| ГАНА                 | МАЛАЙЗИЯ                | ТРИНИДАД И ТОБАГО         |
| ГВАТЕМАЛА            | МАЛИ                    | ТУНИС                     |
| ГЕРМАНИЯ             | МАЛЬТА                  | ТУРЦИЯ                    |
| ГОНДУРАС             | МАРОККО                 | УГАНДА                    |
| ГРЕЦИЯ               | МАРШАЛЛОВЫ ОСТРОВА      | УЗБЕКИСТАН                |
| ГРУЗИЯ               | МЕКСИКА                 | УКРАИНА                   |
| ДАНИЯ                | МОЗАМБИК                | УРУГВАЙ                   |
| ДЕМОКРАТИЧЕСКАЯ      | МОНАКО                  | ФИДЖИ                     |
| РЕСПУБЛИКА КОНГО     | МОНГОЛИЯ                | ФИЛИППИНЫ                 |
| ДОМИНИКА             | МЬЯНМА                  | ФИНЛЯНДИЯ                 |
| ДОМИНИКАНСКАЯ        | НАМИБИЯ                 | ФРАНЦИЯ                   |
| РЕСПУБЛИКА           | НЕПАЛ                   | ХОРВАТИЯ                  |
| ЕГИПЕТ               | НИГЕР                   | ЦЕНТРАЛЬНОАФРИКАНСКАЯ     |
| ЗАМБИЯ               | НИГЕРИЯ                 | РЕСПУБЛИКА                |
| ЗИМБАБВЕ             | НИДЕРЛАНДЫ              | ЧАД                       |
| ИЗРАИЛЬ              | НИКАРАГУА               | ЧЕРНОГОРИЯ                |
| ИНДИЯ                | НОВАЯ ЗЕЛАНДИЯ          | ЧЕШСКАЯ РЕСПУБЛИКА        |
| ИНДОНЕЗИЯ            | НОРВЕГИЯ                | ЧИЛИ                      |
| ИОРДАНИЯ             | ОБЪЕДИНЕННАЯ РЕСПУБЛИКА | ШВЕЙЦАРИЯ                 |
| ИРАК                 | ТАНЗАНИЯ                | ШВЕЦИЯ                    |
| ИРАН, ИСЛАМСКАЯ      | ОБЪЕДИНЕННЫЕ            | ШРИ-ЛАНКА                 |
| РЕСПУБЛИКА           | АРАБСКИЕ ЭМИРАТЫ        | ЭКВАДОР                   |
| ИРЛАНДИЯ             | ОМАН                    | ЭРИТРЕЯ                   |
| ИСЛАНДИЯ             | ПАКИСТАН                | ЭСТОНИЯ                   |
| ИСПАНИЯ              | ПАЛАУ                   | ЭФИОПИЯ                   |
| ИТАЛИЯ               | ПАНАМА                  | ЮЖНАЯ АФРИКА              |
| ЙЕМЕН                | ПАРАГВАЙ                | ЯМАЙКА                    |
| КАЗАХСТАН            | ПАПУА-НОВАЯ ГВИНЕЯ      | ЯПОНИЯ                    |

Устав Агентства был утвержден 23 октября 1956 года на Конференции по выработке Устава МАГАТЭ, которая состоялась в Центральных учреждениях Организации Объединенных Наций в Нью-Йорке. Устав вступил в силу 29 июля 1957 года. Центральные учреждения Агентства находятся в Вене. Главной целью Агентства является достижение “более скорого и широкого использования атомной энергии для поддержания мира, здоровья и благосостояния во всем мире”.

**Использование  
цитогенетической  
дозиметрии для обеспечения  
готовности и реагирования  
при радиационных  
аварийных ситуациях**



## УВЕДОМЛЕНИЕ ОБ АВТОРСКОМ ПРАВЕ

Все научные и технические публикации МАГАТЭ защищены в соответствии с положениями Всемирной конвенции об авторском праве в том виде, как она была принята в 1952 году (Берн) и пересмотрена в 1972 году (Париж). Впоследствии авторские права были распространены Всемирной организацией интеллектуальной собственности (Женева) также на интеллектуальную собственность в электронной и виртуальной форме. Для полного или частичного использования текстов, содержащихся в печатных или электронных публикациях МАГАТЭ, должно быть получено разрешение, которое обычно является предметом соглашений о роялти. Предложения о некоммерческом воспроизведении и переводе приветствуются и будут рассматриваться в каждом отдельном случае. Вопросы следует направлять по эл. почте в Издательскую секцию МАГАТЭ по адресу:

Группа продажи и рекламы, Издательская секция  
Международное агентство по атомной энергии  
Vienna International Centre  
PO Box 100  
A-1400 Vienna, Austria  
Факс: +43 1 2600 29302  
Тел: +43 1 2600 22417  
Эл. почта: [sales.publications@iaea.org](mailto:sales.publications@iaea.org)  
<http://www.iaea.org/books>

В отношении дополнительной информации  
по этой публикации просьба обращаться:

Центр по инцидентам и аварийным ситуациям  
Департамент ядерной безопасности  
Международное агентство по атомной энергии  
Венский международный центр  
PO Box 100  
1400 Vienna, Austria  
Эл. почта: [official.mail@iaea.org](mailto:official.mail@iaea.org)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ДОЗИМЕТРИИ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ГОТОВНОСТИ  
И РЕАГИРОВАНИЯ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ  
АВАРИЙНЫХ СИТУАЦИЯХ  
МАГАТЭ, ВЕНА, 2014 ГОД  
IAEA-EPR  
© МАГАТЭ, 2014  
Отпечатано МАГАТЭ в Австрии  
Январь 2014 года



## ПРЕДИСЛОВИЕ

Цитогенетическая дозиметрия признана в качестве ценного метода оценки дозы, заполняющего пробел в технологии дозиметрии, особенно в тех случаях, когда имеются трудности в интерпретации данных, в случаях, когда есть основания считать, что лица, не носящие дозиметров, подверглись воздействию радиации, в случаях требований компенсации за лучевые поражения, факт которых не подтвержден однозначными дозиметрическими данными, или в случаях облучения человека в течение рабочей жизни.

МАГАТЭ задействовано в работах, связанных с биологической дозиметрией, начиная с 1978 г. Эта связь выражена в ряде координированных программ научных исследований (CRPs), проведении региональных и национальных учебных курсов, спонсорской поддержке учебных стипендий отдельных лиц и предоставлении оборудования лабораториям государств-членов МАГАТЭ, создающих потенциал биологической дозиметрии.

По результатам этих работ государствам-членам МАГАТЭ были переданы рекомендации относительно основных направлений научных исследований и предложения относительно наиболее соответствующих методов для будущей практической реализации биологической дозиметрии.

Результатом одной из координированных программ научных исследований (CRPs) стала публикации в 1986 г. руководства, озаглавленного «Биологическая дозиметрия: анализ хромосомных aberrаций для оценки дозы (Серия технических докладов № 260). В 2001 г. ему на смену было опубликовано переработанное второе издание, Серия технических докладов № 405.

Настоящая публикация является третьим изданием, значительно пересмотренным и дополненным с учетом существенного прогресса в области в цитогенетической биологической дозиметрии за прошедшее десятилетие.

МАГАТЭ выражает благодарность всем авторам и рецензентам настоящей публикации. Особое признание выражается д-ру Д. Ллойд за его большой вклад в работу.

Настоящая публикация подготовлена совместно с Панамериканской организацией здравоохранения и Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

Ответственным за подготовку настоящей публикации сотрудником МАГАТЭ является г-жа Е. Буглова из Отдела ядерной безопасности.

#### *РЕДАКЦИОННОЕ ПРИМЕЧАНИЕ*

*Использование тех или иных названий стран или территорий не выражает какого-либо суждения со стороны издателя – МАГАТЭ – относительно правового статуса таких стран или территорий, их компетентных органов и учреждений, либо относительно определения их границ.*

*Упоминание названий конкретных компаний или продуктов (независимо от того, были они зарегистрированы или нет) не подразумевает какого-либо намерения нарушить права собственности, и его не следует рассматривать как одобрение или рекомендацию со стороны МАГАТЭ.*



## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |     |
|--|-----|
| 1. ВВЕДЕНИЕ .....  | 3   |
| 1.1. Общие сведения.....   | 3   |
| 1.2. Цель .....  | 6   |
| 1.3. Область применения и история развития.....  | 6   |
| 1.4. Структура.....  | 7   |
| 2. ПРИМЕНЕНИЕ КОНЦЕПЦИЙ ДОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ .....                              | 9   |
| 3. ОБЩИЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О ХРОМОСОМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ.....                            | 11  |
| 4. ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА .....  | 17  |
| 5. СТРУКТУРА ХРОМОСОМ.....   | 21  |
| 5.1. Упаковка хроматина.....   | 21  |
| 5.2. Кариотип человека и содержание ДНК в хромосомах.....                                  | 22  |
| 5.3. Клеточный цикл.....   | 25  |
| 6. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ .....                                  | 27  |
| 6.1. Радиационно-индуцированные повреждения ДНК.....                                       | 27  |
| 6.2. Аберрации хромосомного типа.....  | 29  |
| 6.3. Аберрации хроматидного типа .....   | 35  |
| 6.4. Преждевременная конденсация хромосом.....   | 37  |
| 6.5. Микроядра.....  | 40  |
| 7. ВЗЯТИЕ КРОВИ .....  | 43  |
| 7.1. Выбор времени .....   | 43  |
| 7.2. Антикоагулянт .....   | 44  |
| 7.3. Контейнеры.....   | 44  |
| 7.4. Транспортировка .....   | 44  |
| 8. ПОЛУЧЕНИЕ КРИВОЙ ДОЗА-ЭФФЕКТ <i>IN VITRO</i> .....                                      | 47  |
| 8.1. Общие положения .....   | 47  |
| 8.2. Физические аспекты.....   | 47  |
| 8.3. Статистические аспекты .....  | 50  |
| 9. АНАЛИЗ ДИЦЕНТРИКОВ .....  | 55  |
| 9.1. Культивирование лимфоцитов.....   | 55  |
| 9.2. Процедура фиксации.....   | 59  |
| 9.3. Окрашивание .....   | 61  |
| 9.4. Анализ препаратов на предметных стеклах.....  | 64  |
| 9.5. Регистрация данных .....  | 65  |
| 9.6. Хранение информации и предметных стекол.....  | 66  |
| 9.7. Оценка дозы.....  | 66  |
| 10. АНАЛИЗ ТРАНСЛОКАЦИЙ.....   | 85  |
| 10.1. Процедуры культивирования клеток и фиксации .....                                    | 87  |
| 10.2. Окрашивание хромосом.....  | 88  |
| 10.3. Критерии подсчета .....  | 90  |
| 10.4. Обработка данных .....   | 92  |
| 10.5. Контрольный уровень транслокаций.....  | 94  |
| 10.6. Персистенция транслокаций .....  | 98  |
| 10.7. Калибровочные кривые .....   | 99  |
| 10.8. Примеры использования анализа fish для ретроспективной биологической дозиметрии..... | 100 |
| 11. АНАЛИЗ МЕТОДОМ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ КОНДЕНСАЦИИ ХРОМОСОМ (РСС) .....                        | 107 |
| 11.1. РСС путем митотического слияния .....  | 107 |
| 11.2. Химические методы индуцирования РСС .....  | 112 |
| 11.3. Радиационная авария, исследованная методом РСС-колец .....                           | 115 |



## 1. ВВЕДЕНИЕ

### 1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

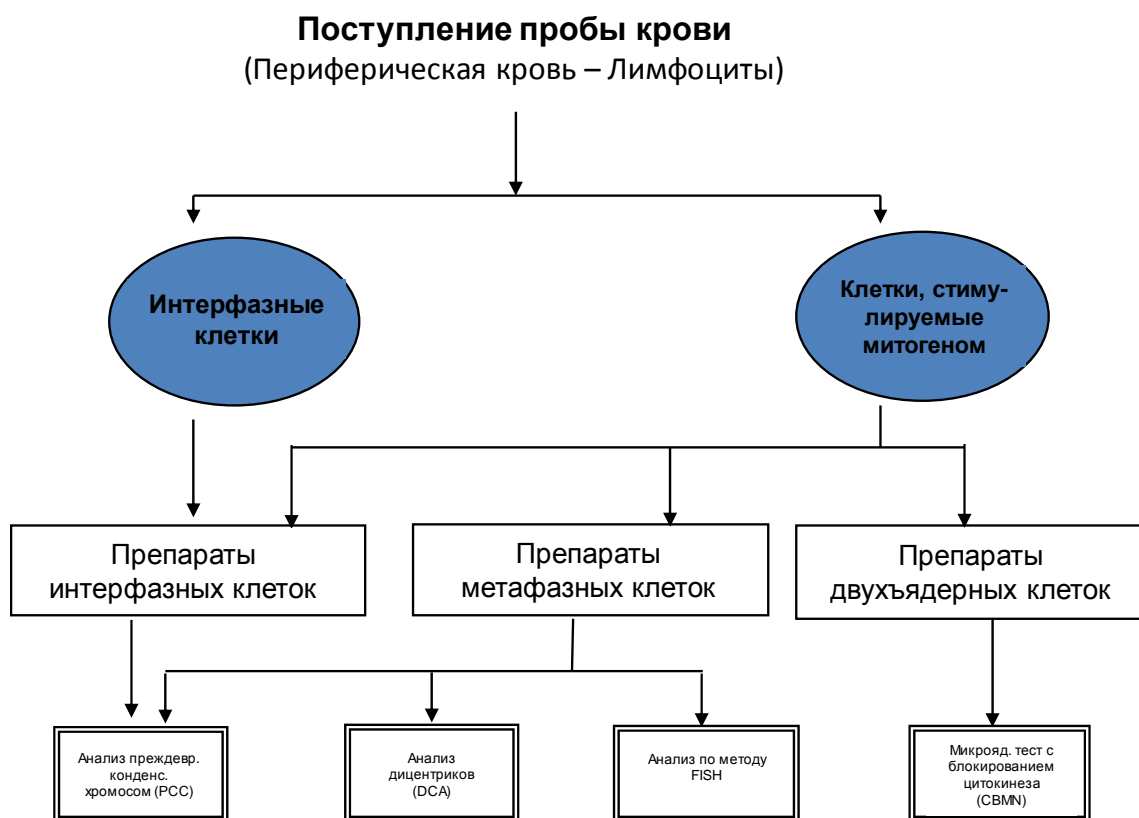
Биологическая дозиметрия, основанная на анализе дицентрических хромосом со сплошным окрашиванием, используется с середины 1960-ых годов. За прошедшее с тех пор время этот метод был настолько усовершенствован, что анализ дицентриков стал обычной составляющей программ радиационной защиты многих государств – членов МАГАТЭ [1]. Опыт его применения в тысячах случаев фактического или подозреваемого переоблучения подтвердил ценность метода и также помог определить его ограничения. Биологическая дозиметрия, использующая биомаркеры хромосомных повреждений, особенно важна потому, что в отличие от физического измерения дозы, она учитывает различие в восприимчивости к излучению между отдельными людьми.

Следует подчеркнуть, что хромосомные аберрации используются в качестве дозиметра и обеспечивают часть входных данных – очень важную часть – в тот набор информации, которая должна быть собрана и рассмотрена при расследовании ядерной или радиологической чрезвычайной ситуации <sup>1</sup> [2]. Диагностическими источниками информации могут быть другие биологические биомаркеры радиационного воздействия, а также клинические признаки и симптомы, проявляемые людьми, и физические измерения, такие как показания персонального нагрудного дозиметра и термолюминесцентного дозиметра, оптически стимулируемой люминесценции или электронно-спинового резонанса на компонентах твердой матрицы облученных лиц (например, зубная эмаль, ногти, извлеченная кость, и т.д.) или связанных с ними предметов (например, стекла часов или очки и т.д.). Информация от опроса пациентов и свидетелей относительно основных фактов, таких как время события и расстояние от источника излучения, может также помочь в вычислении дозы. Информация от всех этих источников может быть объединена с данными биологической дозиметрии для получения более полной оценки рассматриваемого случая.

В течение многих лет анализ дицентриков с использованием лимфоцитов крови был единственным доступным методом биологической дозиметрии, и на сегодняшний день это все еще наиболее часто используемый метод. Дицентрики и другие аберрации могут также наблюдаться в других клетках, таких как фибробласты кожи и внутриротовые эпителиальные клетки, но это выходит за рамки настоящей публикации, которая ограничена темой анализов с использованием лимфоцитов крови. Однако в наше время существует целый ряд других биологических конечных точек: микроядра, транслокации и аберрации в преждевременно конденсированных хромосомах (РСС) (Рис. 1 и Таб. 1), для которых также может быть выполнен анализ в лимфоцитах, и они описаны в настоящей работе.

---

<sup>1</sup> В данном контексте «радиационная чрезвычайная ситуация» означает то же самое что «ядерная или радиологическая чрезвычайная ситуация».



*РИС.1. Схема поступления лимфоцитов периферической крови для различных цитогенетических анализов хромосомных aberrаций, используемых для оценки дозы, таких как анализ преждевременно конденсированных хромосом (PCC), анализ дицентрических (и кольцевых) хромосомных aberrаций на метафазных препаратах (DCA), анализ транслокаций методом флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) на метафазных препаратах, и микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN).*

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ АБЕРРАЦИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДОЗЫ<sup>a</sup>

|  | Цитогенетический анализ аберраций  |   |   |   |
|--|--|---|---|---|
|  | Преждевременно конденсированные хромосомы (PCC)  | Дицентрики (и кольца) (DCA)             | Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)                      | Микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN) |
| Типовые аберрации, подсчитываемые для биологической дозиметрии           | избыточные фрагменты хромосомы; дицентрики <sup>b</sup> и кольца транслокации <sup>b</sup> | дицентрики <sup>b</sup> (и кольца)      | дицентрики <sup>b</sup> (и кольца)<br>транслокации <sup>b</sup> | микроядра<br>нуклеоплазматические мосты             |
| Использование для типовых сценариев облучения                            | острое<br>недавнее облучение   | острое растянутое<br>недавнее облучение | острое растянутое<br>давнее облучение                           | острое растянутое<br>недавнее облучение             |
| Фотон-эквивалентный диапазон острой дозы (Гр) для оценки дозы всего тела | 0,2 - 20   | 0,1 - 5                                 | 0,25 - 4  | 0,3 – 4   |
| Целесообразен для случаев частичного облучения тела                      | Да   | Да                                      | н/д <sup>c</sup>  | н/д   |
| Целесообразен для оценки дозы с целью сортировки                         | Да   | Да                                      | н/д   | Да  |
| Статус стандартизации анализа  | н/д  | Стандарты ISO [3, 4]                    | н/д   | Стандарт ISO — готовится к выпуску, и [5]           |

<sup>a</sup> Модифицированная таблица из Справочника ТМТ [6].

<sup>b</sup> Специфические хромосомные аберрации, как правило, обнаруживаются при помощи центромерных и целенохромосомно-специфических ДНК-зондов.

<sup>c</sup> н/д – нет данных.

В других анализах, выходящих за рамки настоящей публикации, используются молекулярные конечные точки для измерения разрывов ДНК, изменений в регуляции некоторых сторожевых генов или присутствия белковых биомаркеров, которые могут быть обнаружены в клетках или в плазме/ сыворотке крови. Это область быстро появляющихся новых технологий, где на разных этапах разработки и верификации находится множество анализов. В настоящее время доступность целого ряда методов биологической дозиметрии позволила предложить мультипараметрический подход к исследованию переоблученного человека [7], а наличие разнообразных анализов может быть особенно ценным в случаях, если лаборатория задействована в событии с большим количеством пострадавших.

При расследовании радиационных чрезвычайных ситуаций дозу облученных лиц важно оценить по ряду причин. В случае сильных облучений ( $>1$  Гр, острое), информация о дозах помогает планировать терапию и сигнализирует врачам о вероятных детерминированных медицинских последствиях (повреждение тканей), которые могли развиваться в течение недель и месяцев после облучения.

При облучениях ниже того уровня, при котором требуется лечение, дозиметрическая информация важна для того, чтобы врач мог предоставить консультацию облученным лицам относительно риска развития у них стохастических последствий, т.е. ракового заболевания. Для лиц с очень низким облучением знание того, что никакого существенного повышения в повреждении хромосом у него не обнаружено, часто действует очень успокаивающе. Это особенно относится к тем случаям, когда детали событий малоизвестны, а какие-либо физические измерения или вычисления дозы отсутствуют. Тогда биологическая дозиметрия может быть единственным средством количественного определения дозы, хотя, как будет рассмотрено ниже, существуют проблемы количественного определения, связанные с такими факторами, как неравномерное облучение, поступление радионуклидов внутрь организма и отсроченный забор крови.

Биологическая дозиметрия также играет важную роль в ранний период после радиационной чрезвычайной ситуации или террористической атаки, где могло быть облучено большое количество людей. В это время необходимо проведение сортировки пострадавших с использованием биологических и клинических конечных точек, при помощи которых можно на начальном этапе оперативно выявить лиц, подозреваемых в облучении дозами, опасными для жизни, а также определить дозу для сортировки.

## 1.2. ЦЕЛЬ

Главная цель настоящей публикации состоит в том, чтобы предоставить пользователю техническую информацию для выбора и стандартной реализации соответствующего цитогенетического метода, обеспечивающего сопоставимую оценку дозы после аварийного облучения ионизирующим излучением. В публикации описано четыре возможных цитогенетических метода (Рис. 1 и Таб. 1), доступных для биологической дозиметрии в настоящее время. Целесообразно иметь все эти методы в состоянии готовности в основных географических регионах, но, учитывая степень международного сотрудничества и сетевые связи, нет необходимости иметь их все в наличии в каждой национальной биологической дозиметрической лаборатории.

## 1.3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ

Первое руководство из этой серии [1] было сосредоточено исключительно на анализе дицентриков. Это была своевременная публикация, сыгравшая заметную роль в биологической дозиметрии и часто цитировавшаяся. Она была написана для чтения на двух уровнях. Во-первых, она должна была служить лабораторным руководством, являясь удобным и исчерпывающим источником информации на техническом уровне. Кроме того, она должна была обеспечить краткое изложение технических основ данного предмета для использования в преподавании радиобиологии или для таких лиц, как медицинские физики, юристы или ответственные работники, которым может потребоваться некоторое профессиональное понимание биологической дозиметрии.

В пересмотренное издание этого руководства [8], изданное 15 лет спустя, было включено окрашивание хромосом по методу FISH, преждевременная конденсация хромосом (PCC) и микроядерный тест с блокировкой цитокинеза (CBMN).

И вот еще через 10 лет был создан настоящий документ. Большая часть первоначального текста по анализу дицентрических (и кольцевых) хромосомных aberrаций (DCA) на метафазных препаратах из предыдущих изданий по-прежнему остается в силе и сохранена, хотя в соответствующих местах была пополнена последними данными. Методы анализа FISH, PCC и CBMN были значительно пересмотрены в свете последних исследований и опыта их использования. Было неизбежно, что за 25 лет между этими тремя изданиями область цитогенетической дозиметрии значительно расширится и станет технически более сложной. Однако настоящее издание продумано таким образом, чтобы не отпугнуть минимально оборудованную лабораторию, лишь входящую в эту область. Можно воспользоваться лишь материалом из тех разделов, которые относятся к двум наиболее важным анализам, которые следует у себя создать, а именно, анализ дицентриков и микроядер. Приводятся четкие рекомендации относительно применения этих анализов на практике путем построения базовых кривых доза-эффект и интерпретации данных, полученных при исследовании случаев переоблучения.

Главная новая разработка последних лет, отраженная в этом пересмотренном издании – это меры для реализации сортировки при радиационных событиях с большим количеством пострадавших. Рассматриваются вопросы, как биологическая дозиметрическая лаборатория может реагировать на внезапный скачок числа случаев в своей работе, используя количественные анализы в режиме сортировки, ускоряя анализы при помощи компьютерной микроскопии и используя сетевые связи с другими лабораториями. Так совпало, что одновременно с расширением возможностей для совместной работы при реагировании на чрезвычайные ситуации были выпущены международные руководящие принципы по обеспечению качества, контролю качества и участию в межлабораторных сравнительных работах. Эти темы получили освещение в настоящем издании.

Наличие целого ряда цитогенетических анализов повышает ценность биологической дозиметрии, поскольку ни один анализ не является достаточно надежным для всех потенциальных сценариев облучения, включая ранние стадии острого облучения, частичное облучение тела, ретроспективное или предшествующее облучение (например, биопроба спустя годы после облучения), а также применения, связанные с цитогенетической сортировкой для событий с большим числом людей, пострадавших от облучения.

#### 1.4. СТРУКТУРА

В настоящей публикации материал расположен следующим образом: после данного «Введения» (Раздел 1), в Разделе 2 рассматривается понятие «доза» применительно к повреждениям хромосом и ее связь со значением индивидуальной дозы, выведенным при помощи физических методов, и понятие эквивалентной дозы, как ее определяет Международная комиссия по радиационной защите (МКРЗ). В Разделе 3 приводятся некоторые общие сведения из биофизики и микродозиметрии применительно к индуцированию хромосомных повреждений. Далее в Разделе 4 приводится краткое описание лимфоцитов человека, поскольку для биологической дозиметрии, используются Т-лимфоциты. В Разделе 5 рассматривается в общих чертах структура хромосом. В Разделе 6 рассматриваются типы повреждений ДНК, индуцированных взаимодействиями с ионизирующим излучением, а также приводится описание и классификация тех хромосомных aberrаций, которые могут наблюдаться в лимфоцитах после облучения. В Разделе 7 описаны требования к забору крови, а в Разделе 8 рассматриваются физические, биологические и статистические требования к построению кривых доза-эффект. Далее в Разделах 9, 10, 11 и 12 описаны методы выполнения биологической дозиметрии с использованием четырех цитогенетических конечных точек: дицентрики, транслокации по флуоресцентной гибридизации *in situ*, преждевременно



конденсированные хромосомы и микроядра. В Разделе 13 рассматриваются значительные достижения последних лет в развитии автоматических средств хромосомного анализа, а в Разделе 14 рассматриваются новые подходы, способствующие наиболее эффективному реагированию сообщества специалистов хромосомной дозиметрии на события с большим числом пострадавших. В Разделе 15 приведены рекомендации и процедуры обеспечения качества, а в заключительном Разделе 16 рассматриваются вопросы безопасности персонала лабораторий, выполняющего цитогенетический анализ. После полного современного списка литературы идут семь Приложений, в первых четырех из которых описаны воспроизводимые рабочие протоколы анализа дицентриков (DCA), транслокаций по методу FISH, преждевременно конденсированных хромосом (PCC) и микроядерного теста с блокированием цитокинеза (CBMN). В Приложении V рассматриваются критерии для измерения митотического индекса, и Приложение VI содержит справочные материалы по ряду статистических критериев, которые широко используются при анализе данных биологической дозиметрии и проведении научных исследований в этой области. В заключительном Приложении VII представлен учебный пример межлабораторной работы по обеспечению качества при подсчете дицентриков и оценке дозы. Публикация заканчивается списком использованных сокращений, глоссарием важных технических терминов, а в конце приводится список лиц, принимавших участие в составлении и рецензировании этого в значительной мере переработанного и дополненного третьего издания.

## 2. ПРИМЕНЕНИЕ КОНЦЕПЦИЙ ДОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

В данном разделе представлена краткая информация о терминах дозиметрии, физическом значении поглощенной дозы и ее интерпретации для биологической (цитогенетической) оценки дозы, полученной от аварийного облучения различными видами ионизирующего излучения.

Хромосомные aberrации в лимфоцитах используются для оценки поглощенной дозы лиц, подвергшихся повышенному радиационному воздействию. Aberrации, подсчитанные в лимфоцитах, интерпретируются с точки зрения поглощенной дозы путем соотнесения с калибровочной кривой доза-эффект. Эту кривую необходимо получить путем облучения крови *in vitro* дозами соответствующего вида излучения. Следует обеспечить соотносимость доз, сообщенных пробам крови, с основным или вторичным стандартом при помощи какого-либо физического прибора, например, ионизационной камеры.

Физические устройства для измерения фотонов и нейтронов калибруются, как правило, в единицах воздушной кермы, и поэтому при рассмотрении доз, полученных тканью (или пробам крови), необходимо использовать поправочные коэффициенты. Для фотонов их получают из отношения массовых коэффициентов поглощения энергии, и значения, которые следует использовать, можно получить из стандартных таблиц [9]. Для нейтронов приборы могут быть основаны на материале, эквивалентном ткани, и таким образом показывать дозу в ткани. В качестве альтернативы некоторые основные или вспомогательные дозиметрические лаборатории выполняют калибровку в единицах флюенса нейтронов, который может быть пересчитан в дозу в ткани.

Поскольку отмечаемая биологическая конечная точка представляет собой хромосомные aberrации, то, строго говоря, именно они отражают дозу в ядрах клеток. Для фотонов и нейтронов доза в мягкой ткани является очень хорошей аппроксимацией к дозе в ядре. Это объясняется малым диаметром ядра лимфоцита, ~6 мкм, по сравнению с диапазонами размеров вторичных частиц, создаваемых как фотонами, так и нейтронами. Следовательно, можно использовать теорию полостей Брэгга-Грея [10].

Однако имеется ряд исключений. Например, при воздействии тритиевой воды расстояния, проходимые бета-частицами, находятся в диапазоне 0–7 мкм. Поэтому большая часть дозы в ядре клетки обусловлена излучениями трития, содержащегося в этом ядре. В этом случае доза в ядре лимфоцита создает основу для калибровки, и это зависит от содержания воды в ядре относительно ее содержания в крови [11]. Другим примером может быть облучение нейтронами низкой энергии, менее 100 кэВ, где протоны отдачи имеют пробег меньше 2 мкм. В этом случае доза в ядре лимфоцита будет связана с содержанием в нем водорода. Однако маловероятно, чтобы авария повлекла за собой облучение с преобладанием нейтронов именно этого диапазона энергий.

Значение дозы, полученное соотнесением измеренного выхода aberrаций, таких как дицентрики, с калибровочной кривой, представляет усредненную поглощенную дозу в лимфоцитах. Ее можно приближенно приравнять к усредненной дозе облучения всего тела, поскольку лимфоциты повсеместно распространены в организме и мобильны. Ниже в настоящей публикации будут описаны методы, при помощи которых иногда возможно усовершенствовать оценку дозы облучения всего тела для ситуаций, где имело место неравномерное или частичное облучение тела от внешних источников.

Большинство внутренне инкорпорированных радионуклидов также вызывают неравномерное облучение, но в этом случае беспокойство вызывает не доза в лимфоцитах, а скорее доза в определенных органах и тканях, где осаждаются радиоактивность. Хромосомный анализ часто дает не совсем полноценный результат, поскольку после приема, например, радиойода, в лимфоцитах индуцируются аберрации, но их нельзя интерпретировать как дозу в щитовидной железе.

Исключения представляют нуклиды, широко распространенные в организме человека, такие как тритиевая вода или радиоцезий, для которых опыт показал, что анализ аберрации лимфоцитов дает обоснованные оценки дозы.

При ретроспективной биологической дозиметрии – через десять и более лет после облучения – когда транслокации измеряются при помощи метода FISH, оценка дозы представляет среднюю дозу в активном костном мозге. Это объясняется тем, что первоначальному облучению подверглись стволовые клетки-предшественники лимфоцитов, которые попадают в подсчет. В течение более короткого времени транслокации наблюдаются в смеси долгоживущих лимфоцитов и потомков облученных стволовых клеток.

Часто основанием для исследования становится результат обычного измерения дозы, зарегистрированный индивидуальным дозиметром. Индивидуальные дозиметры обычно калибруются для измерения персональной эквивалентной дозы на заданной глубине. Это оперативное показание обеспечивает приемлемую оценку эффективной или эквивалентной дозы для большинства полей излучения, с которыми сталкиваются на практике. Эффективная доза и эквивалентная доза предназначены для использования в радиологической защите. Они не подходят для определения эффектов высоких поглощенных доз.

Поэтому рекомендуется, чтобы лаборатории, выполняющие биологическую дозиметрию, калибровали свои процедуры в единицах поглощенной дозы (Гр), и приводили, по возможности, достаточно деталей для того, чтобы охарактеризовать вид и качество излучения [12–15].

### **3. ОБЩИЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О ХРОМОСОМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ**

В данном разделе приведена информация, предназначенная для оказания помощи в понимании и интерпретации тех принципов, которые лежат в основе методики, представленной в следующих разделах. За дополнительной информацией следует обращаться к [16, 17].

Когда ионизирующее излучение проходит через какой-либо объект, оно выбивает электроны из атомов, через которые оно проходит, оставляя положительно заряженные ионы. Распределение первичных событий, ионизация и возбуждение вдоль трека ионизирующей частицы могут быть различными, в зависимости от типа излучения. Средний интервал между этими первичными событиями уменьшается с ростом заряда и массы частиц (нейтроны или альфа-частицы). Как будет рассмотрено ниже, необходимо конкретно определить излучение с точки зрения количества энергии, выделенной на единицу длины трека, поскольку эта характеристика влияет на эффективность определенного вида излучения в отношении индуцирования различных биологических конечных точек.

Одним из полезных сравнительных терминов для описания выделения энергии различными видами излучений является линейная передача энергии (ЛПЭ). Для излучений с широким диапазоном ЛПЭ, например, нейтронов, можно вывести среднее значение ЛПЭ. Его можно получить путем взвешивания каждого интервала ЛПЭ в соответствии с переданной энергией (или дозой) или в соответствии с длиной пройденного трека. Таким образом, получаем среднедозовую и среднетрековую ЛПЭ, соответственно. Представляется, что среднетрековая ЛПЭ является лучшей величиной для описания изменений относительной биологической эффективности (ОБЭ) для хромосомных повреждений [18]. Среднетрековая ЛПЭ для рентгеновского излучения с энергией 250 кВ в пике составляет приблизительно 2 кэВ/мкм, по сравнению с тяжелыми заряженными частицами, среднетрековая ЛПЭ которых составляет 100–2000 кэВ/мкм. Важно учитывать тот факт, что как один и тот же вид излучения, так и различные виды излучения могут значительно различаться по количеству энергии, выделенной на один микрон трека, и это может несомненно сказываться на биологической эффективности различных видов излучения.

Одним из следствий распределения ионизации для излучений с различной ЛПЭ является распределение частоты хромосомных aberrаций между клетками. При низкой ЛПЭ или редкоионизирующем излучении ионизация в любой определенной дозе будет беспорядочно распределена между клетками, в частности, потому, что количество треков очень велико. Повреждения ДНК будут также беспорядочно распределены между клетками, и, если исходить из допущения равной вероятности потенциального преобразования любого повреждения в aberrацию, то aberrации будут также беспорядочно распределены между клетками. Было показано, что это имело место после рентгеновского или гамма-облучения, когда индуцированные aberrации хромосом соответствуют распределению Пуассона. При высоком значении ЛПЭ или при плотноионизирующем излучении треки ионизации будут распределены между клетками небеспорядочно, с выделением энергии более «дискретными пакетами». Число треков будет намного меньше, чем при излучении с низкой ЛПЭ при эквивалентных дозах. В результате, при тех же допущениях, что и для излучения с низкой ЛПЭ, индуцированные aberrации будут небеспорядочно распределены между клетками. При любой наблюдаемой средней частоте aberrаций будет больше клеток с множественными aberrациями и с нулевыми aberrациями, чем ожидается при распределении Пуассона. Эти особенности могут быть полезными в биологической дозиметрии, что будет рассматриваться в Разделе 9.7.4.3, в частности, при неравномерном или частичном облучении тела.

Эффективность различных видов излучения в отношении индуцирования определенной биологической конечной точки обычно представляется термином «относительная биологическая эффективность» (ОБЭ). ОБЭ определяется как отношение дозы эталонного излучения (обычно ортонапряжение рентгеновского излучения) к дозе определенного исследуемого излучения, оказывающей такой же биологический эффект. Таким образом,

$$RBE = \frac{\text{доза рентг. изл. 200 - 250 кВ в пике, вызывающая эффект Z}}{\text{доза радиации, вызывающая эффект Z}} \quad (1)$$

Следует отметить, что рентгеновское излучение в 2-3 раза эффективнее гамма-излучения, и поэтому всегда необходимо определять эталонное излучение [19].

На Рис. 2 показаны линейная и линейно-квадратичная кривые доза-эффект дицентриков, имеющие типовую форму, которые были получены при излучении с высокой и низкой ЛПЭ, соответственно.

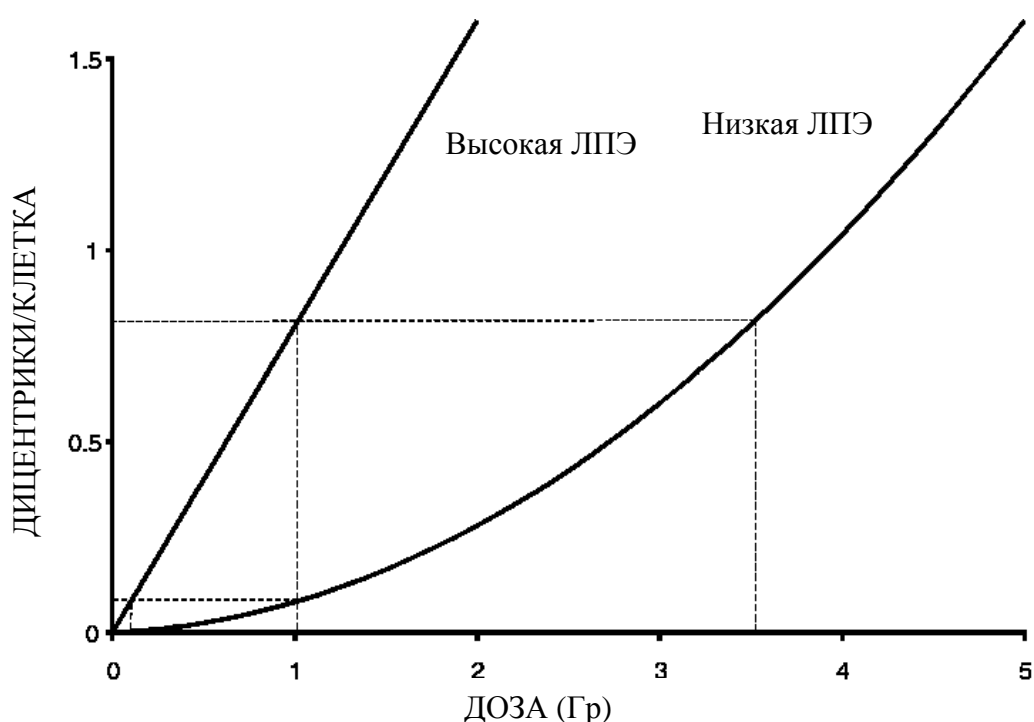


РИС. 2. Типовые линейная и линейно-квадратичная кривые доза-эффект, показывающие изменение ОБЭ с выходом [8].

Формы кривых объясняются ниже в данном Разделе. ОБЭ при высоком выходе дицентриков, который можно связать с большими дозами, проиллюстрирован верхней горизонтальной пунктирной линией, пересекающей две кривые в значениях 1,0 и 3,5 Гр. ОБЭ, являющееся отношением двух доз, составляет  $3,5/1,0 = 3,5$ . Более низкая горизонтальная пунктирная линия пересекает кривые в 0,1 и 1,0 Гр, что дает более высокую ОБЭ:  $1,0/0,1 = 10$ . Максимальная ОБЭ, описывающая ситуацию при низких дозах, обычно обозначаемая как  $RBE_m$ , является отношением линейных коэффициентов уравнений выхода этих двух кривых.

Было показано для многих конечных точек (включая мутации, лизис клеток и хромосомные aberrации), что ОБЭ изменяется в зависимости от ЛПЭ таким образом, что получается кривая ответа в форме горба (Рис. 3).

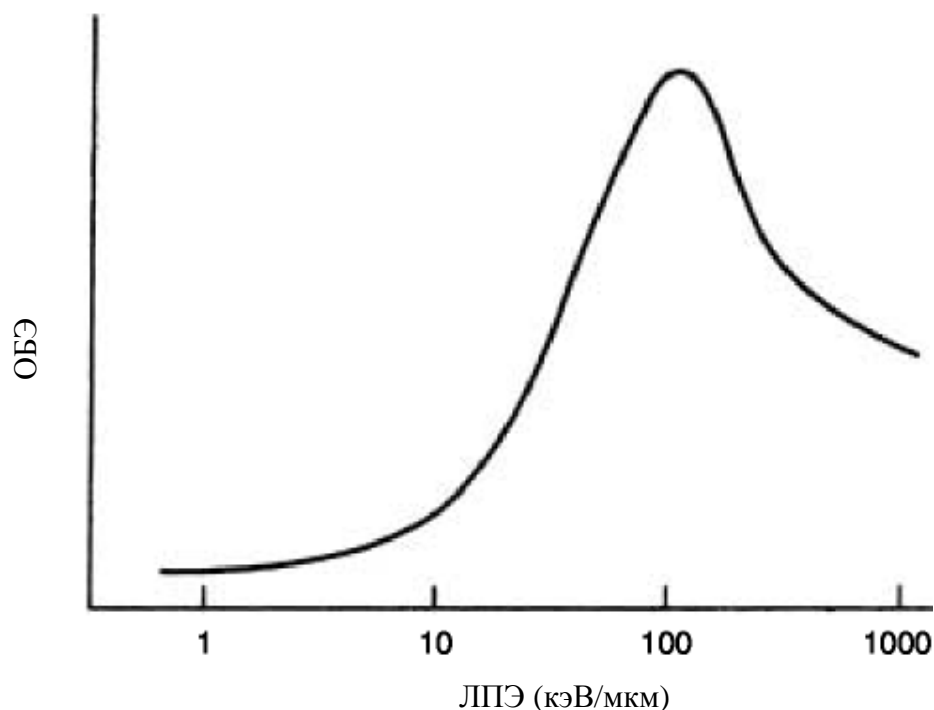


РИС. 3. Обобщенная зависимость ОБЭ от ЛПЭ [8].

Эта кривая показывает, что ОБЭ увеличивается до оптимального значения приблизительно 100 кэВ/мкм, затем уменьшается при более высоких значениях ЛПЭ. Интерпретацию кривой здесь лучше всего рассмотреть применительно к индуцированию хромосомных aberrаций. В качестве примера возьмем aberrацию с образованием дицентриков, частично потому что она обязательно связана с взаимодействием (или обменом) между двумя хромосомами, а также потому, что именно этот тип aberrаций чаще всего используется в биологической дозиметрии.

Для того, чтобы возникла aberrация с образованием дицентриков, должно быть индуцировано повреждение ДНК в двух задействованных нереплицированных хромосомах таким образом, что в поврежденных хромосомах может произойти обмен. Этот обмен может произойти либо в результате неправильной репарации разрывов нити ДНК, индуцированных непосредственно излучением, либо в результате неправильной репарации во время эсцизионной репарации оснований. Таким образом, можно видеть, что повреждения в этих двух хромосомах для неправильной репарации должны находиться близко друг к другу, в пределах того, что называют, «расстояние воссоединения». Эту определенную область можно рассматривать как мишень. В этой мишени должны возникнуть два повреждения, по одному в двойной спирали ДНК каждой нереплицированной хромосомы. Эта мишень, или зона взаимодействия, имеет очень малый размер, обычно считается, что ее диаметр составляет меньше 1,0 мкм. Рентгеновское излучение имеет низкую ЛПЭ, с низкой частотой ионизации на единицы длину трека. Таким образом, вероятность того, что в мишени произойдут два ионизирующих события от одного трека, низка. Для создания повреждения в двух хромосомах, задействованных в дицентрике, необходимы как минимум две ионизации. Намного более высока вероятность того, что эти два повреждения будут произведены ионизацией от двух независимых треков. Частота дицентриков, произведенных ионизацией от одного трека, будет пропорциональна линейной функции дозы, тогда как у дицентриков, индуцированных ионизацией от двух треков, частота будет пропорциональна квадрату дозы. При дозах ниже 0,5 Гр вероятность пересечения мишени двумя треками весьма мала, поэтому дицентрики вызываются почти исключительно

одним треком и с низкой частотой. По мере возрастания дозы увеличивается также доля дицентриков, обусловленных действием двух треков. Таким образом, кривая доза-эффект для дицентриков, индуцированных низкой ЛПЭ (Рис. 2), будет комбинацией одотрековых и двотрековых событий, причем первые имеют большую частоту при низких дозах, а последние намного чаще встречаются при высоких дозах. Обычно предполагается, что кривая доза-эффект соответствует Ур. (2)

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

где:

$Y$  - выход дицентриков,

$D$  - доза,

$C$  - контроль (фоновая частота),

$\alpha$  - линейный коэффициент,

$\beta$  - коэффициент квадрата дозы.

Отношение  $\alpha/\beta$  может называться дозой пересечения. Оно равно дозе, в которой линейный и квадратичный компоненты в равной мере способствуют образованию дицентриков.

По мере возрастания ЛПЭ излучения до максимального значения повышается вероятность того, что два ионизирующих события в одном и том же треке индуцируют повреждения в мишени, что приведет к двум последствиям. Кривая доза-эффект при линейной передаче энергии свыше приблизительно 20 кэВ/мкм будет линейной (Рис. 2). Кроме того, эффективность, или ОБЭ, излучения с повышенной ЛПЭ для индуцирования дицентриков увеличивается с увеличением ЛПЭ в результате увеличения вероятности того, что два повреждения будут вызваны одним треком. Создание двух необходимых повреждений одним треком намного более эффективно, чем случайный процесс образования повреждения вторым треком вблизи повреждения, уже произведенного другим треком, особенно при более низких дозах, где плотность треков низка. Максимальная ОБЭ будет наблюдаться при таком значении ЛПЭ, когда ионизация оптимально разнесена для создания повреждения в каждой из двух спиралей ДНК, вовлеченных в образование дицентриков, без «напрасной траты» энергии, т.е. большей ионизации мишени, чем необходимо. Однако при возрастании ЛПЭ свыше этого оптимального значения в мишени будет выделяться больше энергии, чем необходимо, и при этих обстоятельствах ОБЭ будет уменьшаться с увеличением ЛПЭ, как показано на графике зависимости ОБЭ от ЛПЭ на Рис. 3.

Подводим итог этого обсуждения: кривая доза-эффект (Рис. 2) для излучения с низкой ЛПЭ, протонов высокой энергии и быстрых нейтронов будет нелинейной и лучше всего вписывается в линейно-квадратичную модель; кривая доза-эффект для излучения с высокой ЛПЭ (нейтроны деления и альфа-частицы) будет линейной или близкой к линейной; ОБЭ увеличивается с увеличением ЛПЭ до максимума, составляющего приблизительно 100 кэВ/мкм, и уменьшается при более высоких значениях ЛПЭ (Рис. 3). Как мощность дозы влияет на выход цитогенетических изменений? Для целей обсуждения легче рассмотреть дицентрики, хотя те же принципы относятся к микроядрам и транслокациям. Известно, что те повреждения, индуцированные в ДНК, которые могут преобразоваться в дицентрики, могут быть репарированы за период от нескольких минут до нескольких часов, в зависимости от конкретного повреждения. Если два повреждения, необходимые для индуцирования дицентрика, вызваны отдельными треками, а мощность дозы понижена, есть вероятность того, что повреждение, вызванное первым треком, будет репарировано до того, как мишень будет пересечена вторым треком и возникнет второе повреждение. Хотя оба повреждения были вызваны в одной и той же мишени, они не могут взаимодействовать



таким образом, чтобы произвести дицентрик. Вероятность взаимодействия этих двух повреждений уменьшается с уменьшением мощности дозы; чем ниже мощность дозы, тем меньше частота треков ионизации в единицу времени, и, следовательно, имеется больше времени на репарацию первого повреждения до возникновения второго повреждения. Таким образом, для излучения с низкой ЛПЭ ситуация будет следующей: при уменьшении мощности дозы частота дицентриков на дозу единицы уменьшается. Кривая доза-эффект для дицентриков при очень низкой мощности дозы, где вероятность двухтрековых aberrаций по существу равна нулю, будет линейной, и ее наклон будет равен наклону линейной части линейно-квадратичной кривой для острых облучений. Тот же самый аргумент остается в силе для фракционированных или дробных доз. Если получены две или более доз, повреждения от первой дозы могут взаимодействовать с повреждениями, вызванными второй или последующей дозой, при условии, что временной интервал между первой дозой и последующей фракцией дозы не превышает времени, необходимого для репарации повреждений, индуцированных первой или предыдущей дозой. Таким образом, если время между дозами будет достаточно длительным для репарации между фракциями дозы, то частота дицентриков, вызванных суммарной дозой (суммой фракций), будет меньше, чем от суммарной дозы, доставленной за один раз.

Для излучения с высокой ЛПЭ ситуация может быть другой, поскольку оба повреждения, связанные с индуцированием дицентриков, произведены одним треком. Таким образом, снижение мощности дозы не изменяет частоту дицентриков, поскольку репарация повреждений во время более длительных облучений не будет воздействующим фактором. Тот же самый аргумент относится к фракционированному облучению; репарация повреждений между фракциями не оказывает большого влияния, поскольку оба повреждения произведены одновременно одним треком.

Вопросы, рассмотренные в данном Разделе, показывают, какие факторы необходимо учитывать в практике биологической дозиметрии. На форму кривой доза-эффект влияет качество излучения (ЛПЭ). Поэтому при оценке дозы должна использоваться стандартная кривая качества излучения, которое является тем же самым или весьма схожим с конкретным типом излучения, задействованным в чрезвычайной ситуации. Это важное требование, поскольку существуют очевидные различия в ОБЭ для повреждений хромосом, индуцированных различными излучениями с низкой ЛПЭ даже при том, что для целей радиационной защиты им присвоен одинаковый вес ( $W_R = 1$ ) [19]. Для излучения с низкой ЛПЭ с понижением мощности дозы также уменьшается частота дицентриков на единицы дозу, таким образом, что при очень низкой мощности дозы кривая линейна и является такой же, как линейный компонент кривой доза-эффект для острого облучения. Линейную кривую можно вывести из стандартной кривой острого рентгеновского и/или гамма-излучения и можно использовать в качестве стандартной кривой для хронических облучений, с соответствующими поправками на продолжительность облучения и время жизни лимфоцитов. Для излучения с высокой ЛПЭ изменения в мощности дозы не сказываются на частоте дицентриков, и таким образом, кривая, полученная для острых облучений, может использоваться для хронического или фракционированного облучения, разумеется, с учетом продолжительности облучения и время жизни периферических лимфоцитов.

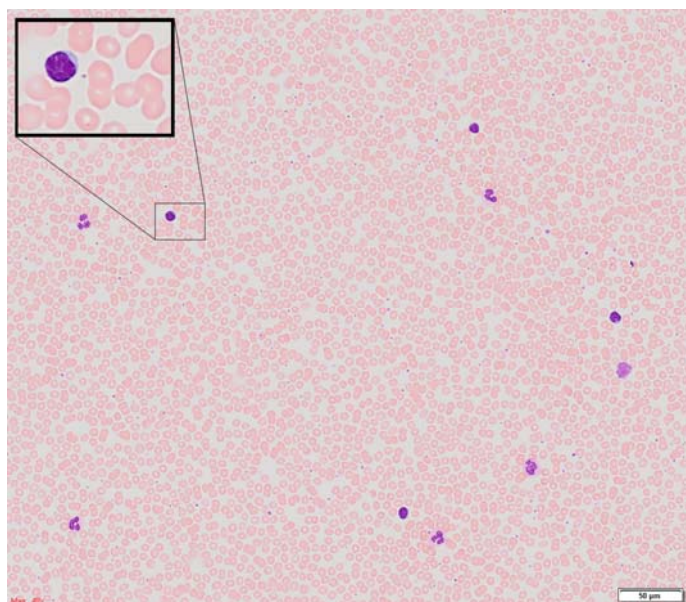


#### 4. ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Периферические лимфоциты человека представляют собой популяцию клеток, находящейся в основном в фазе предсинтеза ДНК клеточного цикла (то есть в фазе G<sub>0</sub>). Только 0,2% или меньше периферических лимфоцитов находятся в автосинтетическом периоде клеточного цикла, и они, вероятно, поступают из пула больших лимфоидных клеток, представляющих стимулированные лимфоциты или незрелые клетки плазмы. Клетки этой группы могут дать начало редким случаям митозов, которые иногда встречаются в периферической крови.

Науэлл [20] первым показал, что периферические «лейкоциты человека» можно стимулировать с целью митоза *in vitro* при помощи фитогемагглютинаина (ФГА), белка, полученного из растения семейства бобовых *Phaseolus vulgaris* (Фасоль обыкновенная). А Карстерс [21] показал, что «малые лимфоциты» являются клетками-мишенями для инициации митогенеза при помощи ФГА.

При наблюдении малых периферических лимфоцитов в мазке крови видны большие плотные ядра, окруженные относительно небольшим количеством цитоплазмы (Рис. 4 и 5). Они имеют диаметр около 6 мкм, а их объем оценивается как приблизительно 110 мкм<sup>3</sup>.



*РИС. 4. Типичный мазок крови с малым лимфоцитом и несколькими эритроцитами, показаны с увеличением.*

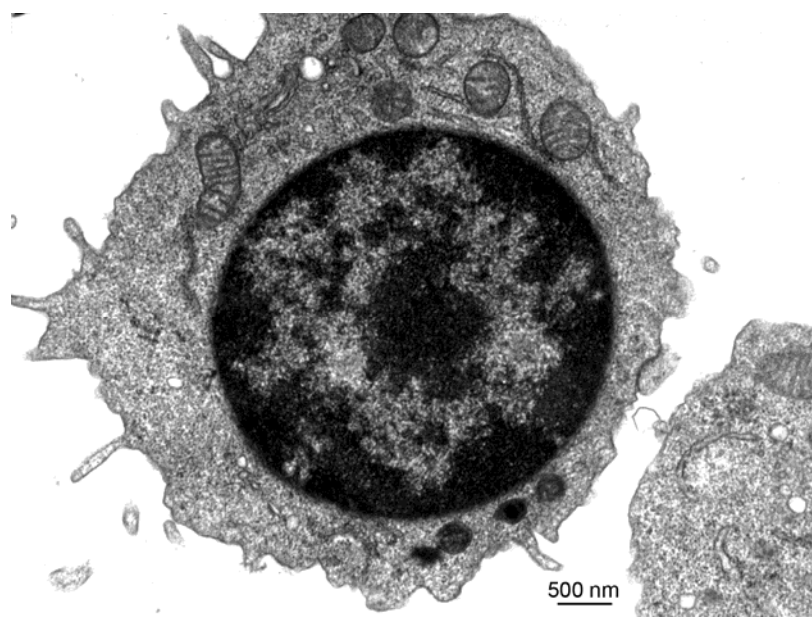


РИС. 5. Малый лимфоцит, вид в электронном микроскопе.

Можно выделить два основных вида лимфоцитов, Т-клетки и В-клетки. Оба вида возникают в иммунологически некомпетентных стволовых клетках желточного мешка и со временем переходят в костный мозг. Эти недифференцированные стволовые клетки мигрируют в тимус и другие основные лимфоидные органы, размножаются, проходя соматические мутации, и дают начало пулу долгоживущих рециркулирующих лимфоцитов. Исходя из их поверхностных маркеров, Т- и В-клетки включают смесь наивных клеток и клеток памяти с различной продолжительностью жизни и различными ролями в иммунологических процессах [22]. В биологической дозиметрии используются Т-клетки, главным образом подтипы  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , которые стимулируются *in vitro* фитогемагглютинином.

Концентрации лимфоцитов в периферической крови зависят от возраста, этнической принадлежности, присутствия болезнетворных микроорганизмов и факторов окружающей среды (таких как курение, тучность, употребление алкоголя и т.д.). Так, определенные этнические популяции (например, в Восточной Африке) показывают более низкие базовые значения лимфоцитов по сравнению с общепопуляционными исходными уровнями. С возрастом обычно наблюдается уменьшение количества лимфоцитов. Это особенно заметно в детские годы, когда наблюдается непрерывное снижение количества лимфоцитов, к 15 годам достигающее значения  $2 \times 10^9/\text{л}$ . У взрослых также обычно наблюдается снижение количества лимфоцитов, но оно происходит медленнее, и в возрасте 75 лет и старше количество лимфоцитов имеет значение ниже  $2 \times 10^9/\text{л}$  [23].

В общем случае для здорового взрослого человека нормальный диапазон содержания лимфоцитов в периферической крови оставляет  $1,5-4,0 \times 10^9/\text{л}$  [24]. Однако в случае облучения большей части тела высокими дозами порядка нескольких грей одна из ранних детерминированных реакций состоит в быстром падении количества лимфоцитов периферической крови. Эти факторы следует принимать во внимание при раннем заборе крови для биологической дозиметрии у лиц, пострадавших от радиации [25].

По оценкам, общее количество лимфоцитов у здорового молодого взрослого человека составляет приблизительно  $500 \times 10^9$ . Лишь около 2% из них ( $10 \times 10^9$ ) находятся в периферической крови, а остальные находятся повсюду в других тканях, особо концентрируясь в тимусе, лимфатических узлах, миндалинах, лимфатических тканях кишечника, в селезенке и в костном мозге. Лимфоциты могут иметь различный срок

жизни, и само определение продолжительности жизни может означать либо что клетка погибает, либо что она делится. Т-клетки подтипов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> могут быть далее разделены на подмножества в зависимости от экспрессии различных изоформ антигена CD45. При рождении свыше 90% Т-клеток экспрессируют изоформу CD45RA, и они получили название непримированных или наивных клеток. К зрелости это значение падает приблизительно до 50% вследствие преобразования в подмножество CD45RO примированных клеток или клеток памяти.

Повреждение хромосом, индуцированное радиотерапией, было изучено в стимулированных ФГА Т-клетках форм RA и RO [26]. Персистенция нестабильного повреждения показала, что наивные клетки RA делятся в среднем один раз в 3,5 года, а клетки памяти RO делятся чаще, в среднем один раз в 22 недели. Клетки памяти могут также вернуться к наивному фенотипу, но лишь после приблизительно 3,5 лет пребывания в классе памяти.

Для интерпретации хромосомных aberrаций, индуцированных *in vivo* у человека, очень важно, чтобы большая часть периферических лимфоцитов относилась к «перераспределительному пулу». Это означает, что лимфоциты должны обладать способностью выходить из периферической крови, проходить через селезенку, лимфатические узлы и другие ткани, и повторно входить в кровоток. Среднее время пребывания какого-либо данного лимфоцита перераспределительного пула в периферической крови составляет около 30 минут. По оценкам, около 80%, т.е.  $400 \times 10^9$  лимфоцитов относятся к перераспределительному пулу, а общее время рециркуляции составляет приблизительно 12 часов. Это означает, что лимфоциты с хромосомными aberrациями, которые были индуцированы где-либо в организме, со временем окажутся в периферической крови. Таким образом, благодаря тест-системе лимфоцитов человека можно обнаруживать не только хромосомные aberrации, которые были индуцированы в лимфоцитах непосредственно в периферической крови, но также и те, которые были индуцированы в лимфоцитах, распределенных в различных органах всего организма [27].

Большинство периферических лимфоцитов находится в фазе «покоя» клеточного цикла (G<sub>0</sub>) и имеет диплоидное содержание ДНК около 5,6 пг. В этих клетках можно *in vitro* инициировать митотическое деление путем введения фитогемоагглютинаина (ФГА). ФГА является весьма универсальным митогеном, который стимулирует широкий спектр Т-клеток. Под влиянием ФГА лимфоциты преобразуются в бластоидные клетки, а объемы ядра и целых клеток увеличиваются. Через 48 часов после стимуляции объем клетки периферических лимфоцитов составляет около 500 мкм<sup>3</sup>, по сравнению с ~110 мкм<sup>3</sup> до стимуляции. Объем цитоплазмы составляет ~50 мкм<sup>3</sup> до стимуляции и ~350 мкм<sup>3</sup> после стимуляции. Объем ядра увеличивается с ~50 мкм<sup>3</sup> до 170 мкм<sup>3</sup> после стимуляции.

Развитие клеточного цикла лимфоцитов после стимуляции фитогемоагглютинином может быть весьма различным в зависимости от условий культивирования с использованием различных культуральных сред, таких как среда Хэма F-10, среда RPMI (Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640), среда TC-199 или минимальная поддерживающая среда (MEM). Например, в среде Хэма F-10 синтез ДНК запускается приблизительно через 26 часов после начала культивирования, и первые митозы обнаруживаются приблизительно через следующие 10 часов. Есть два пика синтеза ДНК, измеряемых при использовании меченного тритием тимидина: один через 34 часа, а второй через 40 часов, и два пика митотической активности: один приблизительно через 44 часа, а второй приблизительно через 49 часов. Здесь могут быть представлены две субпопуляции клеток, демонстрирующие различные схемы стимуляции в культуре, где используется среда Хэма F-10 и ФГА [28]. Однако в лимфоцитах, выращенных в среде TC-199, интерфазы, меченные тритием, так же как митотические индексы, проходят по нестандартной схеме, что затрудняет какие-либо выводы относительно субпопуляций.



## 5. СТРУКТУРА ХРОМОСОМ

### 5.1. УПАКОВКА ХРОМАТИНА

Ассоциация ДНК с гистонами в структуре нуклеосомы была продемонстрирована весьма детально, хотя ассоциация негистоновых белков с нуклеосомой понятна еще не полностью. Кроме того, известно, что ДНК является внешней структурой по отношению к гистоновому ядру нуклеосомы. В соответствии с некоторыми исследованиями, существует осевая структура ядра, образованная негистоновыми белками или каркасом из негистоновых белков [29, 30] в метафазной хромосоме. Причастность таких структур ядра к образованию хромосомных aberrаций пока еще не выяснена. Осевые структуры могут также быть продемонстрированы в оптическом микроскопе как окрашенные серебром области хромосомы в различных фазах митоза. Хотя существование организованного ядерного белкового матрикса в интерфазе хорошо подтверждено документально, существование каркаса в метафазных хромосомах, вероятно, является артефактом. Модель организации метафазной хромосомы показана на Рис. 6.

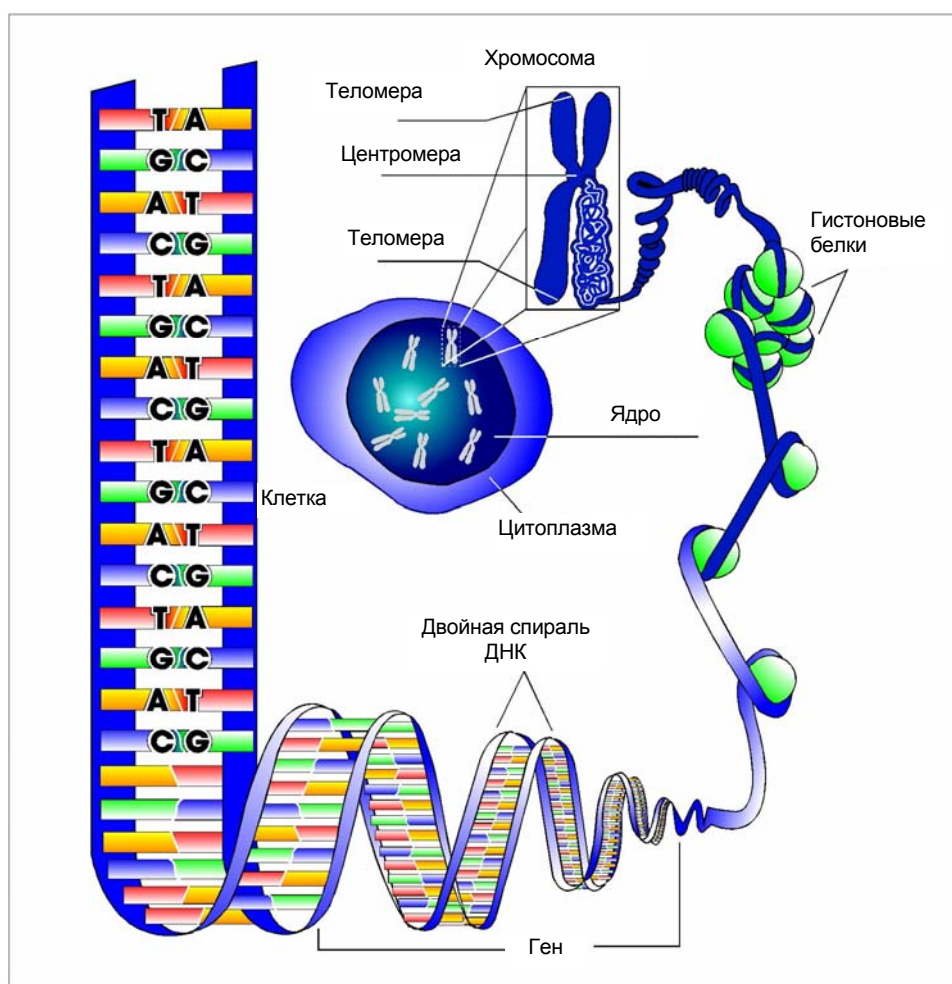
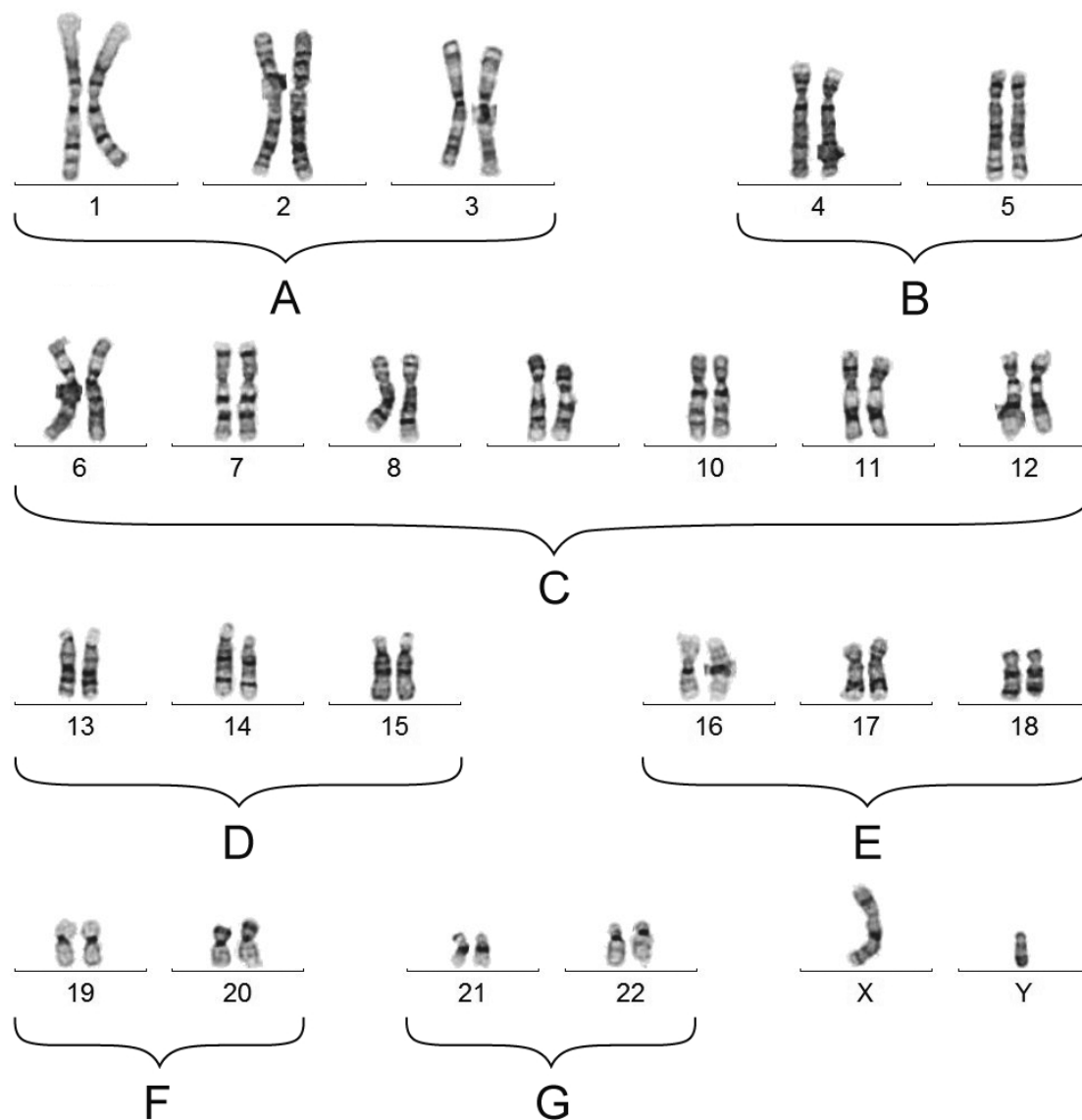


РИС. 6. Схематическая иллюстрация различных уровней упаковки хроматина, которые дают начало высоко конденсированной метафазной хромосоме (с разрешения REA/TS, США).

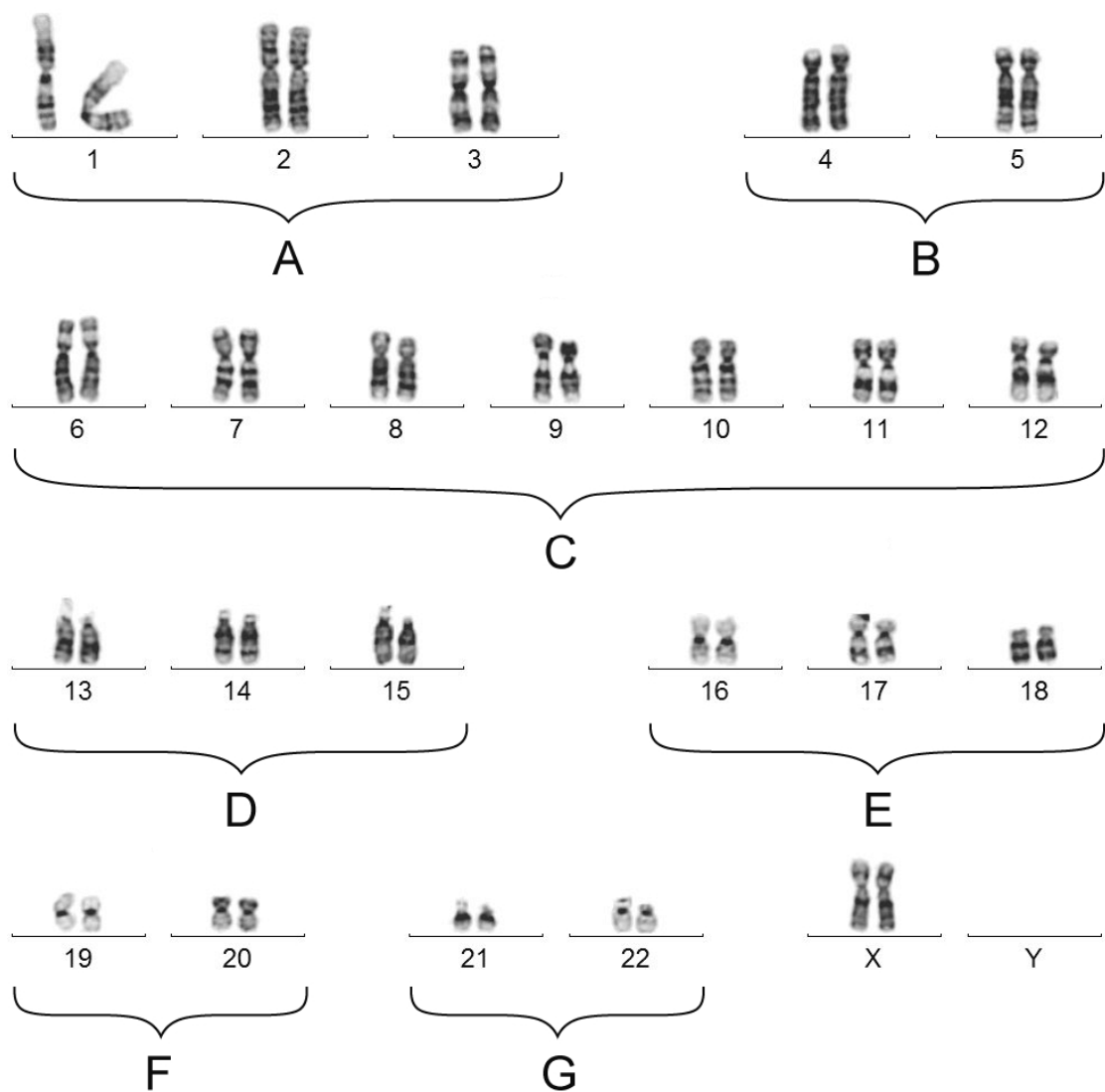


## 5.2. КАРИОТИП ЧЕЛОВЕКА И СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ХРОМОСОМАХ

Кариотип человека (Рис. 7) – это характерный набор хромосом человека, состоящий из 23 пар больших линейных хромосом различного размера, что в общей сложности дает 46 хромосом в каждой диплоидной клетке. Хромосомы человека обычно объединяют в семь групп от А до G плюс пара половых хромосом X и Y [31]. Хромосомные группы: А: 1–3, В: 4 и 5, С: 6 – 12, D: 13–15, E: 16–18, F: 19 и 20 и G: 21 и 22.



*Мужчина*



*Женщина*

*РИС. 7. Дифференциально-окрашенная хромосома/кариотипный препарат нормального мужчины 46 лет, XY, и нормальной женщины 46 лет, XX (с разрешения Клиники Мейо, США).*

Относительное содержание ДНК в хромосомах человека любого пола показано в Таблицах 2 и 3. Эти данные были вычислены из работы Мортонa, 1991 [32].

ТАБЛИЦА 2. ПРОЦЕНТ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ГЕНОМЕ МУЖЧИНЫ, ЗАНИМАЕМЫЙ КАЖДОЙ ПАРОЙ АУТОСОМ И КАЖДОЙ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМОЙ

| Номер<br>хромосомы | Плечо<br>р | Плечо<br>q | Оба<br>плеча | Номер<br>хромосомы | Плечо<br>р | Плечо<br>q | Оба<br>плеча |
|--------------------|------------|------------|--------------|--------------------|------------|------------|--------------|
| 1                  | 4,03       | 4,25       | 8,28         | 13                 | 0,50       | 3,09       | 3,59         |
| 2                  | 3,12       | 4,92       | 8,04         | 14                 | 0,50       | 2,93       | 3,43         |
| 3                  | 3,12       | 3,62       | 6,74         | 15                 | 0,54       | 2,80       | 3,34         |
| 4                  | 1,76       | 4,63       | 6,39         | 16                 | 1,23       | 1,86       | 3,09         |
| 5                  | 1,64       | 4,47       | 6,11         | 17                 | 0,88       | 2,02       | 2,90         |
| 6                  | 2,05       | 3,72       | 5,77         | 18                 | 0,63       | 2,05       | 2,68         |
| 7                  | 2,05       | 3,34       | 5,39         | 19                 | 0,94       | 1,17       | 2,11         |
| 8                  | 1,57       | 3,31       | 4,88         | 20                 | 0,98       | 1,29       | 2,27         |
| 9                  | 1,61       | 2,96       | 4,57         | 21                 | 0,35       | 1,23       | 1,58         |
| 10                 | 1,38       | 3,15       | 4,53         | 22                 | 0,41       | 1,35       | 1,76         |
| 11                 | 1,83       | 2,71       | 4,54         | X                  | 0,97       | 1,61       | 2,58         |
| 12                 | 1,23       | 3,27       | 4,50         | Y                  | 0,20       | 0,73       | 0,93         |
| Total              |            |            |              |                    |            |            | 100          |

ТАБЛИЦА 3. ПРОЦЕНТ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ГЕНОМЕ ЖЕНЩИНЫ, ЗАНИМАЕМЫЙ КАЖДОЙ ПАРОЙ АУТОСОМ И КАЖДОЙ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМОЙ

| Номер<br>хромосомы | Плечо<br>р | Плечо<br>q | Оба<br>плеча | Номер<br>хромосомы | Плечо<br>р | Плечо<br>q | Оба<br>плеча |
|--------------------|------------|------------|--------------|--------------------|------------|------------|--------------|
| 1                  | 3,97       | 4,18       | 8,15         | 13                 | 0,49       | 3,04       | 3,53         |
| 2                  | 3,07       | 4,83       | 7,90         | 14                 | 0,50       | 2,88       | 3,38         |
| 3                  | 3,07       | 3,56       | 6,63         | 15                 | 0,53       | 2,76       | 3,29         |
| 4                  | 1,74       | 4,55       | 6,29         | 16                 | 1,21       | 1,83       | 3,04         |
| 5                  | 1,61       | 4,40       | 6,01         | 17                 | 0,87       | 1,98       | 2,85         |
| 6                  | 2,02       | 3,66       | 5,68         | 18                 | 0,62       | 2,01       | 2,63         |
| 7                  | 2,01       | 3,29       | 5,30         | 19                 | 0,93       | 1,15       | 2,08         |
| 8                  | 1,55       | 3,25       | 4,80         | 20                 | 0,96       | 1,27       | 2,23         |
| 9                  | 1,58       | 2,91       | 4,49         | 21                 | 0,34       | 1,21       | 1,55         |

| Номер<br>хромосомы | Плечо<br>p | Плечо<br>q | Оба<br>плеча | Номер<br>хромосомы | Плечо<br>p | Плечо<br>q | Оба<br>плеча |
|--------------------|------------|------------|--------------|--------------------|------------|------------|--------------|
| 10                 | 1,36       | 3,10       | 4,46         | 22                 | 0,40       | 1,34       | 1,74         |
| 11                 | 1,80       | 2,66       | 4,46         | X                  | 1,92       | 3,16       | 5,08         |
| 12                 | 1,21       | 3,22       | 4,43         |                    |            | Total      | 100          |

### 5.3. КЛЕТочный ЦИКЛ

Важная информация о кластогенных эффектах физических или химических агентов в интерфазных клетках может быть получена при исследовании хромосом в точке следующего деления клетки, которой для соматических клеток является митоз. У клеточного цикла есть ряд фаз, которые различаются по своему внешнему виду и функции (Рис. 8).

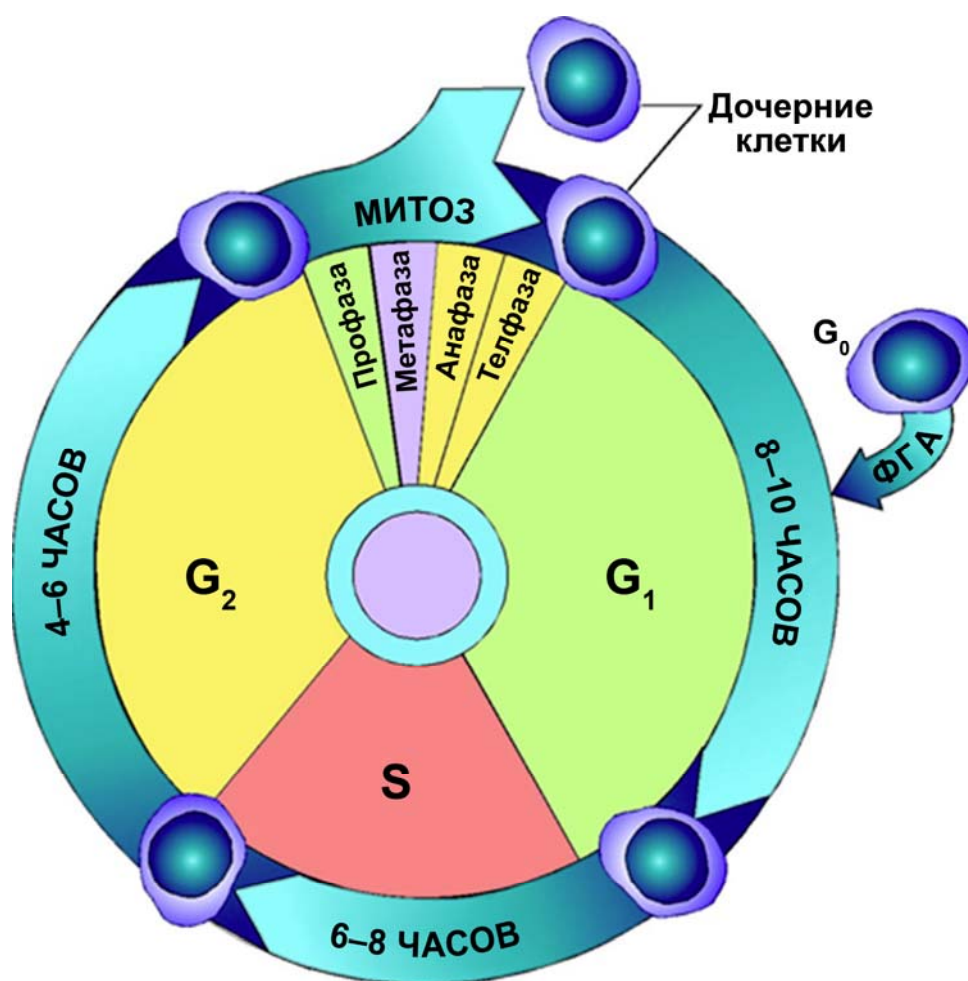


РИС. 8. Клеточный цикл (с разрешения REAC/TS, США).

В митозе выделяют такие фазы как профаза, метафаза, анафаза и телофаза. Во время интерфазы происходит удвоение хромосомного материала (т.е. ДНК и ассоциированных белков). Этот период интерфазы называют «S» (синтетический), ему предшествует период, называемый G<sub>1</sub> (пресинтетический), а после него следует период G<sub>2</sub> (постсинтетический). Для клеток, которые не участвуют в цикле, например, лимфоцитов периферической крови, клетка остается в G<sub>0</sub>.

Для циркулирующих клеток интерфаза является метаболически наиболее активной частью клеточного цикла, и большинство требующих энергии реакций в ядре происходят на этом этапе. Продолжительность каждого этапа цикла меняется в зависимости от типа клетки и условий роста. Можно определить продолжительность этих этапов при помощи радиомеченых предшественников ДНК, таких как меченный тритием тимидин. Применительно к лимфоцитам первый клеточный цикл после стимуляции почти синхронизирован, и эти клетки особенно удобны для радиобиологических исследований. Циркулирующие клетки млекопитающих в культурах, конечно, не синхронизированы, но их можно синхронизировать несколькими методами. Различные этапы клеточного цикла имеют различную чувствительность к действию химических соединений или радиации, и виды возникших хромосомных aberrаций изменяются в зависимости от того этапа клеточного цикла, на котором произошло воздействие [33]. Следовательно, при проведении таких исследований важно работать с синхронизированной популяцией, или по крайней мере иметь оценку количественного соотношения клеток на различных этапах, которые присутствуют во время воздействия.

Прохождение клеточного цикла контролируют в различных контрольных точках, с тем чтобы гарантировать максимальное соответствие целостности ДНК и надлежащее хромосомное расщепление на дочерние клетки. Основные контрольные точки действуют в конце периода  $G_1$  до репликации, в конце периода  $G_2$  до митоза, и при переходе между метафазой и анафазой, до хромосомного расщепления и деления клетки. В этих контрольных точках развитие клеточного цикла может быть заблокировано, если будет обнаружено повреждение ДНК, неполная репликация или аномальная структура веретена.

## 6. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Первое доказательство того, что рентгеновские лучи могут вызвать хромосомные aberrации, поступило от Мюллера [34] по результатам генетических исследований плодовой мушки дрозофила. Это было подтверждено цитологическими исследованиями Пейнтера и Мюллера [35]. Позже Сакс [36] разработал для происхождения хромосомных aberrаций, индуцированных рентгеновскими лучами, «гипотезу первичности разрыва» («breakage first»). Далее Ревелл [37] предложил альтернативную обменную гипотезу («exchange hypothesis»). По существу, Сакс [36] предположил, что поврежденные участки отдельных хромосом вступают в контакт после полного разрыва, а концы свободно перемещаются и в конечном счете объединяются с возникновением обмена. В противоположность этому, Ревелл [37] считал, что точки повреждения не являются полными разрывами, а представляют собой нестабильные сайты, которые могут взаимодействовать с аналогичными сайтами и образовывать попарные обмены. Существует и третья возможность, представленная позже Чедвиком и Линхаутсом [38], взаимодействие повреждения и неповреждения, в соответствии с которой сайт, являющийся поврежденным в понимании Ревелла, может взаимодействовать с неповрежденной хромосомой, и при этом образуется обмен.

### 6.1. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

Под воздействием ионизирующего излучения во времени и пространстве возникают события с дискретным выделением энергии (такие как шпоры, блобы и треки), которые вызывают прямое повреждение ДНК, а также ее косвенное повреждение при образовании активных частиц, главным образом, за счет радиолиза воды [39]. Биофизические исследования структуры треков показывают, что излучение с низкой ЛПЭ может вызвать образование локализованных кластеров ионизации в треке одного электрона. Излучение с высокой ЛПЭ вызывает несколько большее число ионизаций, пространственно близких друг к другу [17] (Рис. 9А). Ионизирующее излучение вызывает в ДНК разнообразные повреждения, включая повреждение оснований, одностранные разрывы, AP-сайты, ДНК-белковые сшивки и двустранные разрывы (Рис. 9В).

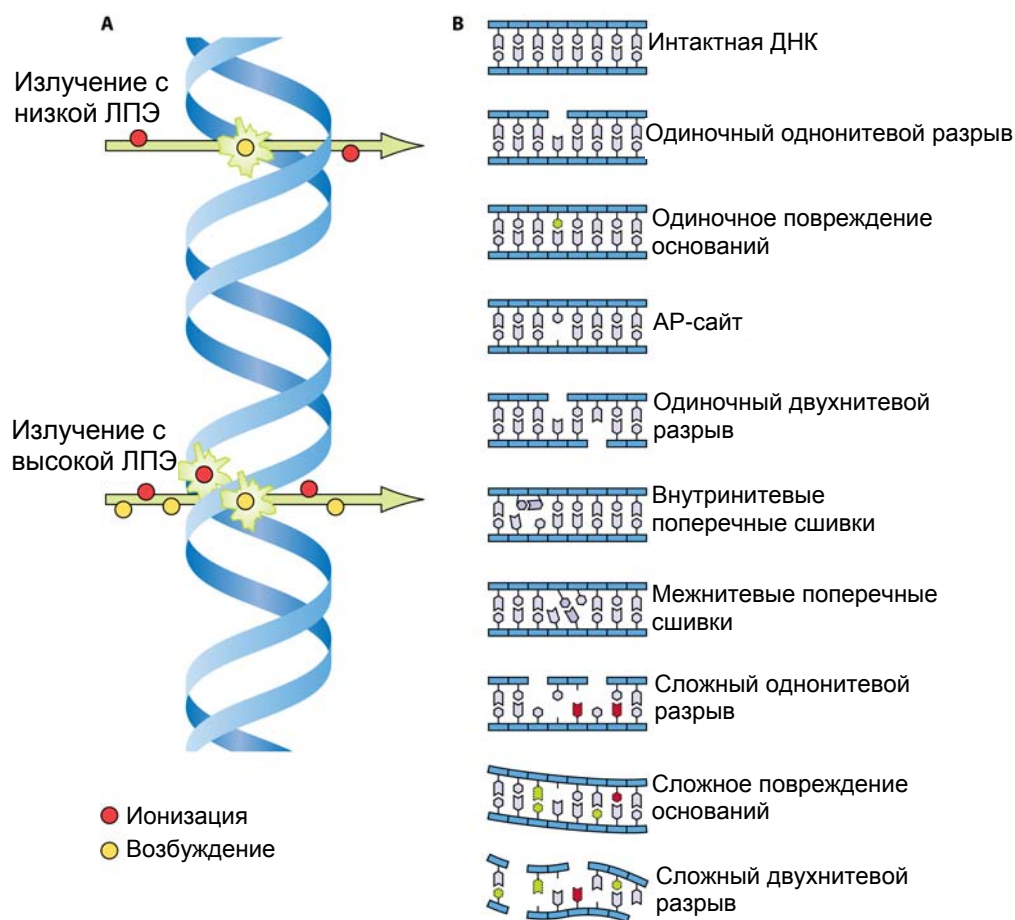


РИС. 9. Схема ионизации для излучения с низкой и высокой ЛПЭ (А) и радиационно-индуцированные повреждения ДНК (В) [40, 41].

Энергия для образования ионной пары ( $\text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$ ) при радиоллизе воды составляет ~20 эВ, а энергия событий ионизирующего излучения находится в диапазоне до сотен электрон-вольт, в среднем 60 эВ. Поскольку эта энергия достаточна для образования приблизительно трех ионных пар, реагирование образовавшихся радикалов будет происходить вблизи конкретной области. Возникшие повреждения ДНК для всех видов излучения могут быть одиночными повреждениями ДНК, включающими одонитевые разрывы, AP-сайты или повреждение оснований, а также сайты с множественными повреждениями или кластерные повреждения ДНК [42]. Сайты с множественными повреждениями, возникшие в ДНК, могут включать один или более двухнитевых разрывов, несколько одонитевых разрывов, а также повреждение оснований. Репарация комплексных кластерных повреждений ДНК может оказаться более трудной или даже невозможной, вследствие чего потенциально могут образоваться летальные хромосомные aberrации [43].

Клетка может реагировать на повреждение ДНК при помощи комплексной трансдукции сигналов, контрольных точек клеточного цикла и путей репарации. Повреждения оснований, AP-сайты и одонитевые разрывы репарируются различными процессами, такими как эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация ДНК нуклеотидов (NER) и репарация одонитевых разрывов (SSBR) [44, 45]. ДНК-белковые сшивки репарируются при помощи эксцизионной репарации ДНК нуклеотидов (NER) и репарации путем гомологической рекомбинации (HRR) [46]. Двухнитевые разрывы являются критическими повреждениями и их неправильная репарация или отсутствие репарации задействованы в образовании таких хромосомных



аббераций, как дицентрики или транслокации [47]. Двумя главными механизмами репарации двухнитевых разрывов являются репарации путем гомологической рекомбинации (HRR) и соединение негомологичных концов (*NHEJ*) [48, 49]. Эти два механизма действуют на различных фазах клеточного цикла. В то время как соединение негомологичных концов (*NHEJ*) существенно способствует репарации двухнитевых разрывов на всех фазах клеточного цикла, репарация путем гомологической рекомбинации (HRR) вносит скромный вклад во время фазы  $G_1$  с последующим ростом воздействия по мере перехода клетки по циклу в фазу  $G_2$  [50]. Всесторонний обзор биофизических и молекулярных процессов, приводящих к образованию хромосомных аббераций под воздействием излучения, опубликован в работе Сасаки [51].

## 6.2. АБЕРРАЦИИ ХРОМОСОМНОГО ТИПА

Схемы классификации хромосомных аббераций представлены в работах [52, 53].

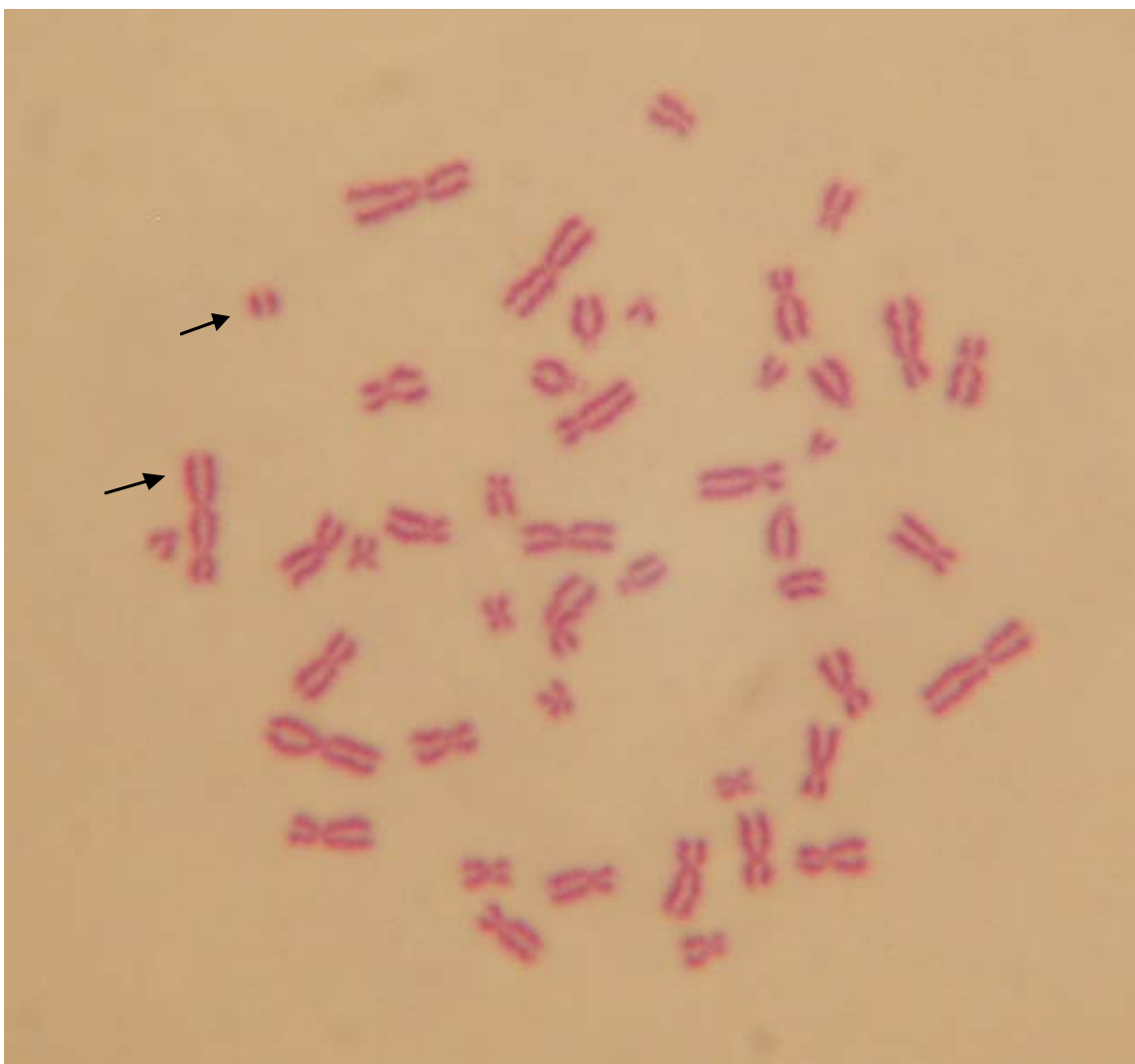
Популяция периферических лимфоцитов, прошедших митогенетическую стимуляцию, обычно не поступает в циркуляцию, а находится в фазе  $G_0$  клеточного цикла. Следовательно, хромосомные абберации, индуцированные излучением, будут абберациями хромосомного типа, то есть они включают обе хроматиды хромосомы. Известно, что ионизирующее излучение является *S*-независимым кластогеном, в отличие от ультрафиолетового излучения и химических мутагенов, которые являются *S*-зависимыми агентами. Поэтому в случае ионизирующего излучения после обработки клеток  $G_0/G_1$  и  $G_2/S$  возникают абберации хромосомного и хроматидного типа, соответственно. Однако, ультрафиолет и химические соединения вызывают главным образом абберации хроматидного типа на всех этапах клеточного цикла. Если абберации хроматидного типа наблюдаются в клетках  $G_0/G_1$ , которые были подвергнуты ионизирующему излучению, можно предположить, что их причиной является не излучение или что они уже прошли через второй клеточный цикл *in vitro*.

Поскольку абберации хроматидного типа не индуцируются за счет облучения лимфоцитов  $G_0$ , то они занимают лишь небольшое место в биологической дозиметрии. Тем не менее, они действительно встречаются как часть общей фоновой частоты хромосомных повреждений и могут присутствовать в избытке, если у человека, исследуемого по подозрению на облучение, имеется также история воздействия химических кластогенов. Поэтому для выполнения подсчета с использованием микроскопа важно быть хорошо осведомленным о хроматидных типах и не путать их с хромосомными типами. Кроме того, с повышением интереса к исследованию нестабильности запаздывающих хромосом и «эффектам свидетеля» снова появился интерес к хроматидным абберациям. В настоящем Разделе рассматриваются абберации хромосомного типа, а в Разделе 6.4 абберации хроматидного типа.

### 6.2.1. Нестабильные абберации

#### *Дицентрики*

Дицентрик (Рис. 10) является основной абберацией, используемой для биологической дозиметрии.

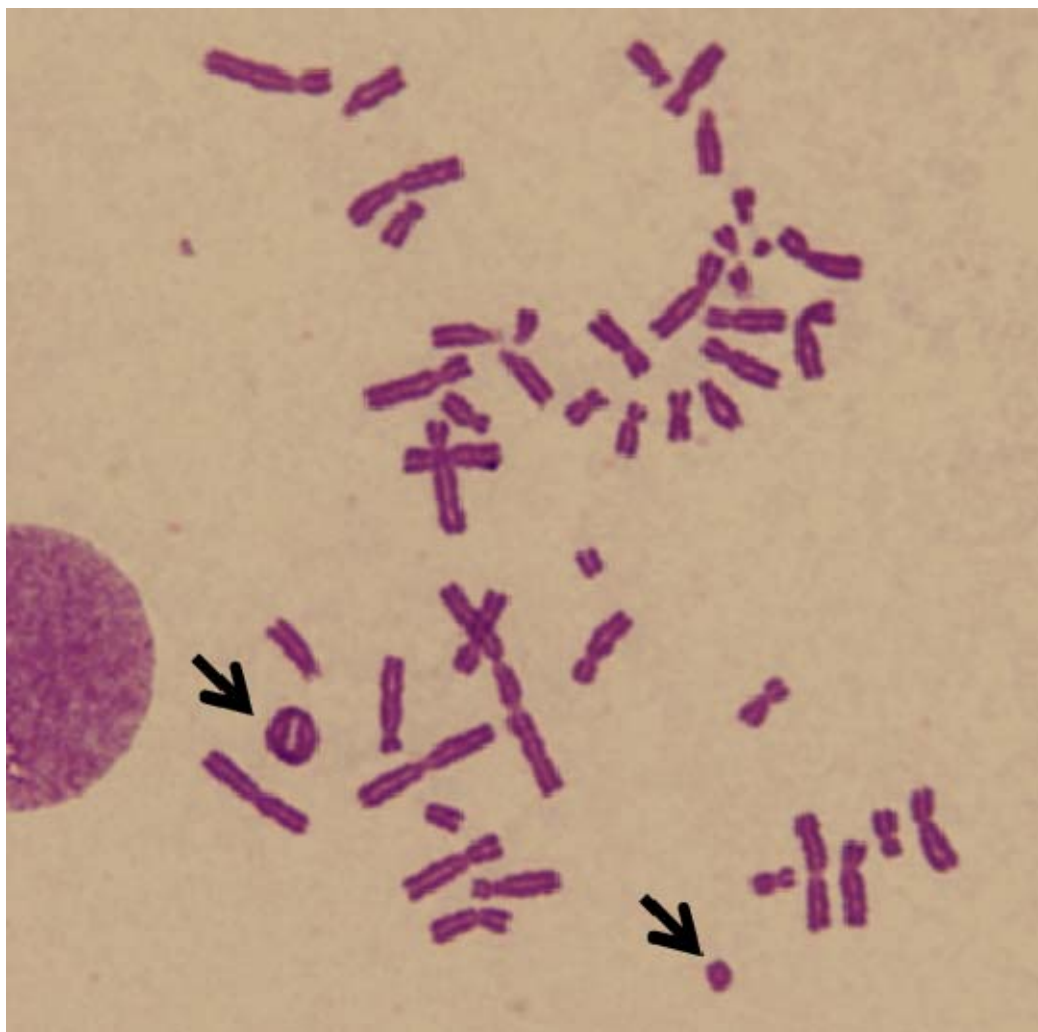


*РИС. 10. Дицентрическая хромосома с сопровождающим ее ацентрическим фрагментом (окрашивание красителем Гимза).*

Это обмен между центромерными частями двух разорванных хромосом, который в своем полном виде сопровождается ацентрическим фрагментом, состоящим из ацентрических частей этих хромосом. В частности, после больших доз могут образоваться мультицентрические конфигурации. Трицентрики сопровождаются двумя фрагментами, квадрацентрики тремя фрагментами и т.д. Количественный анализ дицентриков подробно рассматривается в Разделе 9.

#### *Центрические кольца*

В лимфоцитах человека центрические кольца встречаются намного реже, чем дицентрики. Некоторые исследователи объединяют их с дицентриками, в то время как другие исследователи предпочитают не учитывать их при оценке дозы. Кольцевая хромосома представляет собой обмен между двумя разрывами в отдельных плечах одной и той же хромосомы, она также сопровождается ацентрическим фрагментом (Рис. 11).



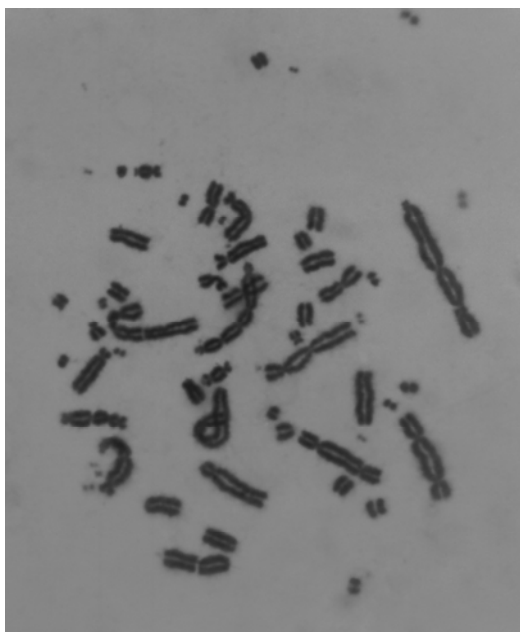
*РИС. 11. Метафазная пластинка с двумя кольцами (отмечены стрелками), дицентрическим и ацентрическим фрагментами (окрашивание красителем Гимза).*

#### *Ацентрики*

Ацентрические aberrации могут возникать независимо от вышеописанных обменов, и в этом качестве их обычно называют избыточные ацентрики. Они могут быть терминальными или интерстициальными делециями переменного размера, но их источник не всегда возможно определить, поэтому их объединяют. Ацентрические кольца, где внутри небольших кольцевых структур можно видеть свободные промежутки, обычно считаются интерстициальными делециями, тогда как точечные фрагменты, кажущиеся парой небольших сплошь окрашенных точек, являются в основном терминальными делециями [54, 55].

#### *Мультиаберрантные клетки*

Мультиаберрантные клетки определяются как метафазные клетки, приготовленные из выращенных лимфоцитов крови, которые показывают чрезвычайно высокие уровни повреждения хромосом в отсутствие явной причины. На Рис. 12 показан пример, где разрыв и перестройка хромосом настолько обширны, что трудно идентифицировать больше чем одну или две моноцентрические хромосомы нормального вида.



*РИС. 12. Мультиабберрантная клетка, наблюдаемая среди 500 нормальных метафаз, взятых у здорового некурящего человека из контрольной группы, без профессионального или медицинского радиационного облучения в анамнезе, живущего в местности с низким содержанием радона. Метафаза показывает характерные особенности многих полицентрических хромосом и ацентрических фрагментов, включая большое количество точечных фрагментов.*

При этом в клетке имеются многочисленные полицентрические хромосомы, ацентрические фрагменты и точечные фрагменты. Точечные фрагменты представляют собой крошечные тела хроматина, содержащие несколько мегаоснований ДНК, и их можно определить как цитогенетические эквиваленты амплифицированных последовательностей ДНК [56].

Эти уникальные клетки наблюдаются во всех расах и этнических группах во всем мире. Например, мультиабберрантные клетки впервые наблюдались в 1968 г. в образцах крови, собранных у индейских племен Яномами, которые населяют тропические леса Венесуэлы [57]. Впоследствии было сообщено о наличии таких клеток у жителей многих стран мира, включая Англию, Японию, Украину, Литву и Российскую Федерацию. Термин «мультиабберрантные клетки» («rogue cells») был введен в обращение учеными Ава и Нилом [58], которые описали эти клетки у потомства как облученных пациентов, так и у необлученных лиц из контрольной группы после бомбардировки Хиросимы. Как и в исследованиях людей, переживших атомную бомбардировку, цитогенетические оценки, полученные для облученного и необлученного населения, живущего вблизи Чернобыля, показали, что мультиабберрантные клетки не связаны с радиационным облучением, поскольку они были также найдены в необлученных контрольных группах [59, 60].

Хотя присутствие мультиабберрантных клеток у людей во всем мире было твердо установлено, их клиническое значение, если таковое существует, неизвестно. В исследованиях, где выполнялась последовательная выборка, было показано, что мультиабберрантные клетки имеют переходной характер, появляясь время от времени в виде коротких всплесков одновременно у определенных лиц в дискретных популяциях. Следует отметить, что в литературе по клинической цитогенетике о мультиабберрантных клетках не сообщается, вероятно, потому, что после длительного трехдневного выращивания, когда происходит 2 или 3 деления клетки, мультиабберрантные клетки, вероятно, теряются. Кроме того, для получения диагноза о нормальном или аномальном состоянии кариотипа человека цитогенетики-клиницисты анализируют относительно небольшое количество метафазных

клеток (т.е. 15-20). В противоположность им радиационные цитогенетики обычно анализируют сотни или даже тысячу и больше метафазных клеток первого деления для одного человека, что значительно увеличивает вероятность обнаружения мультиаберрантных клеток, которые, как известно, встречаются редко. В заключение можно сказать, что этиология и медицинское значение мультиаберрантных клеток в лимфоцитах человека остаются загадкой, хотя некоторые данные свидетельствуют о том, что вирусы, такие как вирус полиомы человека JC, могут играть роль в их экспрессии [61].

Таким образом, с учетом встречаемости мультиаберрантных клеток для большинства задач биологической дозиметрии рекомендуется исключать из оценки дозы выделенные метафазы, в которых появляются мультиаберрантные клетки. Исключением из этой рекомендации могут быть случаи, когда имеются дополнительные доказательства воздействия излучения с высокой линейной передачей энергии, и далее, в идеале, когда имеется несколько клеток с множественными повреждениями, имеющими непрерывный спектр повреждения.

### 6.2.2. Стабильные aberrации

#### *Реципрокные транслокации*

Реципрокная транслокация – это обмен терминальными частями двух отдельных хромосом. Первоначально различные виды транслокаций описывались при помощи метода дифференциального G-окрашивания и кариотипирования, но эта процедура слишком трудоемка для рутинной биологической дозиметрии. При сплошной окраске красителем Гимза достоверность наблюдения транслокаций невысока. В настоящее время транслокации можно использовать для целей дозиметрии благодаря методу FISH (см. Раздел 10). При использовании метода FISH они визуализируются как двуцветные моноцентрические хромосомы (Рис. 13).

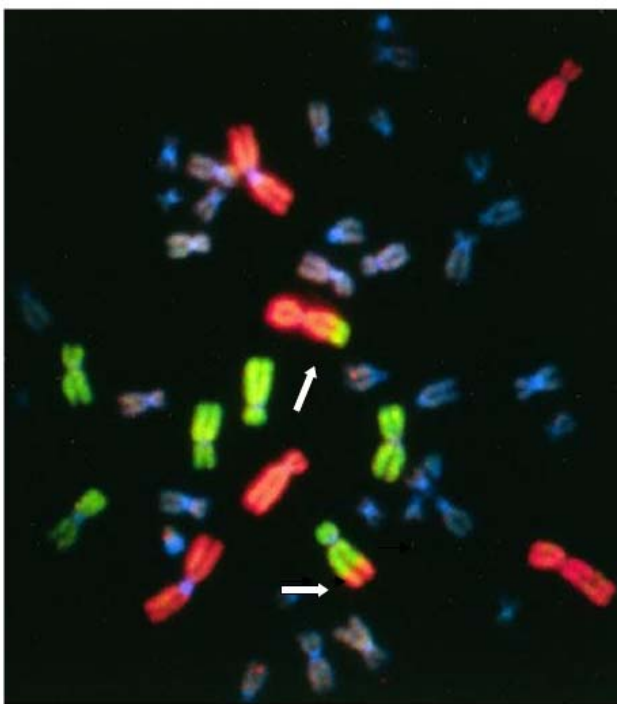


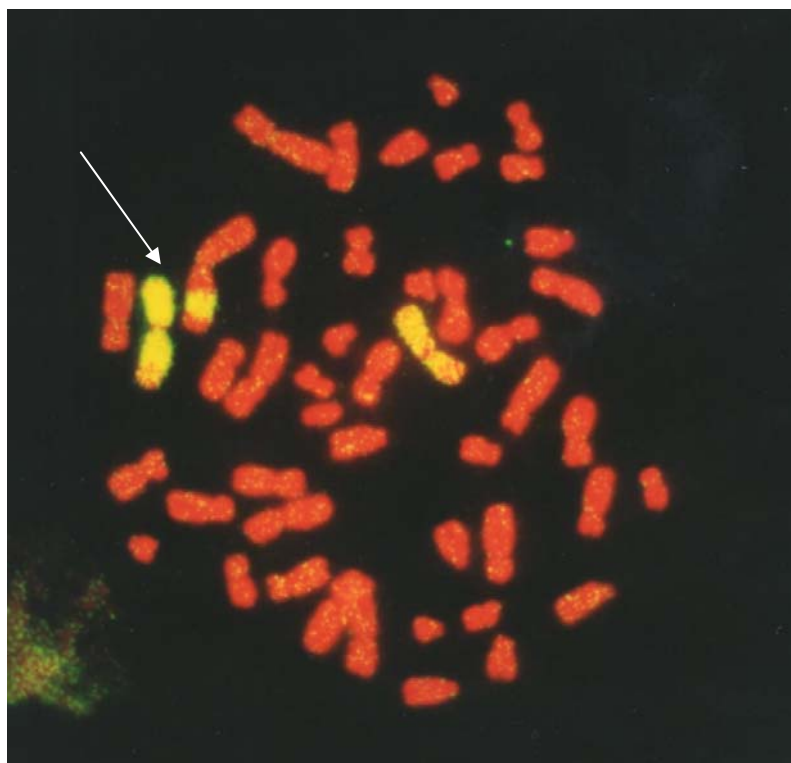
РИС. 13. Метафаза, иллюстрирующая «ропись» хромосом при использовании метода FISH для обнаружения транслокаций. Пары хромосом 1, 2 и 4 окрашены красным, а пары хромосом 3, 5 и 6 окрашены зеленым. Реципрокная транслокация проиллюстрирована двумя двуцветными хромосомами (2 и 5), которые обменялись сегментами на концах своих длинных плеч (с разрешения Ramsey and Tucker, LLNL, США).

### *Нереципрокные транслокации*

Когда можно видеть лишь одну двуцветную хромосому, это часто называют терминальной, или неполной, или однонаправленной транслокацией. Однако при использовании комбинации цельнохромосомного, центромерного и теломерного зондов, многие транслокации, считавшиеся терминальными или неполными, в действительности, как обнаружилось, были реципрокными. Весьма вероятно, что сигнал недостающей части находится ниже предела визуального разрешения, и поэтому было предложено определять такие структуры как однонаправленные обмены или транслокации. Современное представление состоит в том, что истинные терминальные транслокации действительно существуют, но они составляют небольшой процент от общего количества, например, при 4 Гр они составляют приблизительно 5% [62].

### *Интерстициальные транслокации (инсерции)*

Это двуцветная хромосома, где ацентрическая часть одной хромосомы вставлена в плечо другой хромосомы. Пример показан на Рис. 14.



*РИС. 14. Метафазная пластинка крови человека с инсерцией. Пара хромосом 1 окрашена желтым, а все другие хромосомы контрастно окрашены пропидиум йодидом.*

### *Стабильные и нестабильные клетки*

Поскольку стабильные aberrации, такие как реципрокные транслокации, успешно проходят митоз и переходят в дочерние клетки, то можно реализовать ретроспективную биологическую дозиметрию с использованием метода FISH. Однако для выполнения этой задачи необходимо, чтобы весь геном был стабильным. Транслокация может и не быть увязана с делением при наличии несвязанной и нестабильной структуры, например, дицентрика, или при наличии избыточного ацентрика в той же самой клетке. Отсюда возникла необходимость рассматривать стабильность не только отдельных типов



аббераций, но и клетки в целом. К этой концепции много лет назад пришли Бакстон и др., и в работе 1967 г. [63] они ввели обозначения Cs и Cu для стабильных и нестабильных клеток, соответственно. К этой концепции снова обратились в связи с развитием ретроспективной биологической дозиметрии с использованием метода FISH, где было показано, что реципрокные (двунаправленные) транслокации представляются более стабильными, чем неполные (однонаправленные) [64, 65].

### 6.3. АБЕРРАЦИИ ХРОМАТИДНОГО ТИПА

Аберрации хроматидного типа обычно классифицируются так же, как аберрации хромосомного типа; совершенно очевидно, что в большинстве случаев единицей, задействованной в аберрации хроматидного типа, является одна хроматида, а не целая хромосома, как в случае аберраций хромосомного типа.

#### *Терминальные и интерстициальные делеции*

Терминальная делеция представляет собой выраженное смещение фрагмента хроматиды, удалённое от повреждения (Рис. 15).

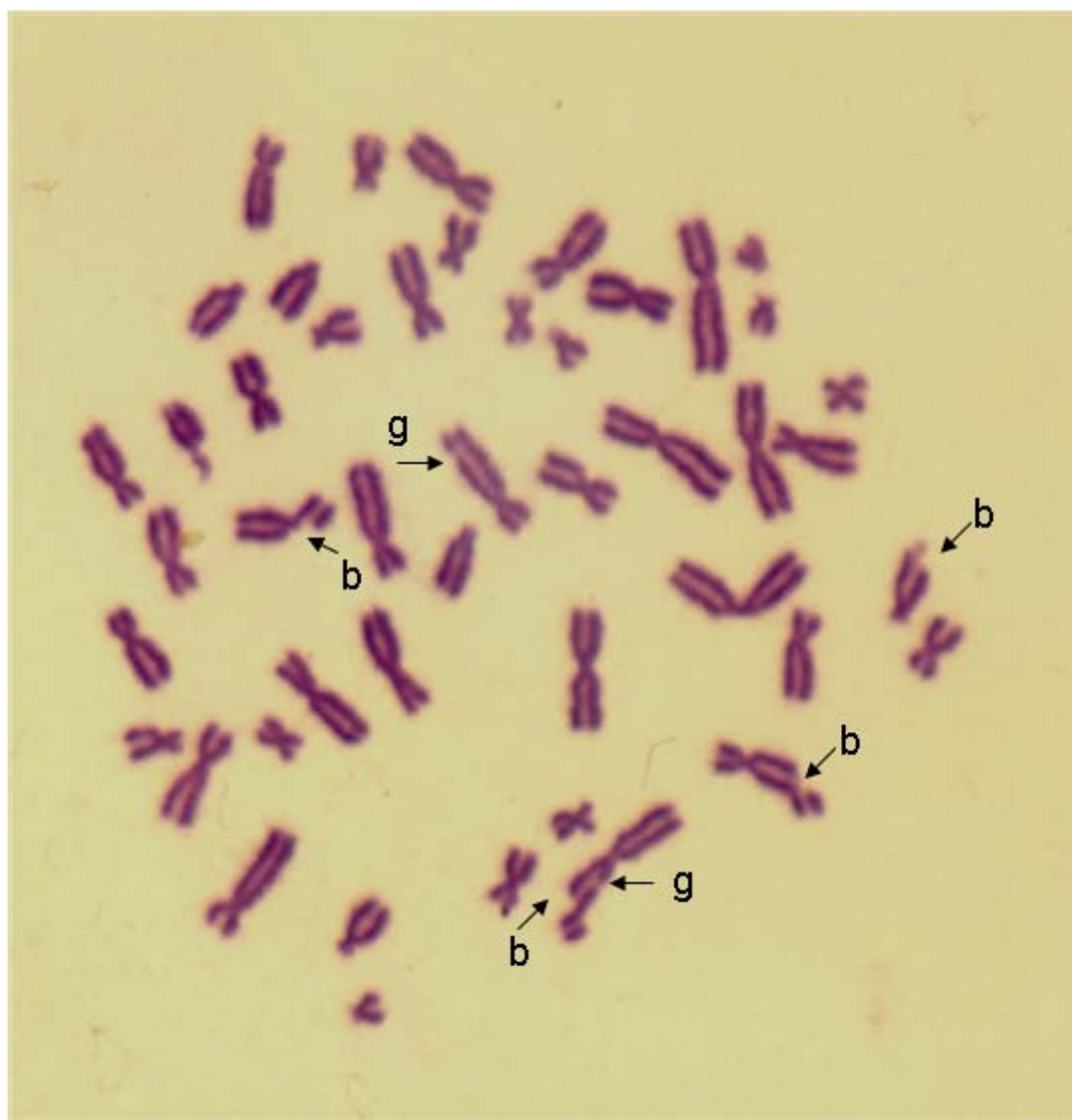


РИС. 15. Метафазная пластинка с хроматидными разрывами (b) и пробелами (g).

Если смещение отсутствует, неокрашенная зона между центрической и ацентрической областями должна иметь большую ширину, чем ширина хроматиды для того, чтобы это считалось терминальной делецией. Это определение используется для различения терминальных делеции (разрывы хроматиды) и бесцветных повреждений (пробелов).

Интерстициальные делеции хроматидного типа не так легко поддаются наблюдению, как соответствующие делеции хромосомного типа, частично потому, что небольшой делетированный фрагмент часто отделен от делетированной хромосомы и не наблюдается.

#### *Бесцветные повреждения*

Бесцветные повреждения (или пробелы), Рис. 15, представляют собой неокрашенные или очень слабо окрашенные области хромосом, присутствующие в одной хроматиде (единичное) или в обеих сестринских хроматидах в видимо идентичных местах (двойное). Если ширина неокрашенной области меньше ширины хроматиды, событие регистрируется как бесцветное повреждение. Совершенно очевидно, что это лишь рабочее определение. Обычно бесцветные повреждения предлагается регистрировать, но всегда отдельно от хроматидных делеций. Их частоту не следует включать в общее количество aberrаций на одну клетку, поскольку их значимость и взаимоотношения с другими типами «истинных» aberrаций в настоящее время неясны.

#### *Изохроматидные делеции*

Изохроматидные делеции представляются исключениями в классе aberrаций хроматидного типа, поскольку в них задействованы обе хроматиды, с видимыми «разрывами» в одном и том же месте на обеих хроматидах. Однако на подходящем материале можно показать, что они индуцированы радиацией в фазах S и G<sub>2</sub> клеточного цикла, как это имеет место для других aberrаций хроматидного типа.

Существует несколько возможных типов в зависимости от характера происходящих сестринских объединений. Если сестринское объединение происходит, изохроматидные aberrации можно отличить от терминальных делеций хромосомного типа. Однако в клетках млекопитающих сестринское объединение является редким событием, и большинство изохроматидных делеций относятся к проксимальным и дистальным типам, не связанным с сестринским объединением. Ацентрический фрагмент чаще всего не связан с делетированной центрической частью хромосомы. Методика анализа предусматривает, что поскольку радиационно-индуцированные aberrации в лимфоцитах фазы G<sub>0</sub> относятся к хромосомному типу, все парные ацентрические фрагменты должны классифицироваться как терминальные делеции хромосомного типа. Так как частота изохроматидных делеций в лимфоцитах в любом случае будет низка, то это правило весьма обосновано.

#### *Асимметричные обмены*

Асимметричные обмены (межплечевые обмены и асимметричные хроматидные обмены) являются хроматидными эквивалентами дицентриков хромосомного типа.

#### *Симметричные обмены*

Симметричные обмены (симметричные хроматидные обмены), Рис. 16, являются хроматидными эквивалентами реципрокных транслокаций хромосомного типа.





*РИС. 16. Метафазный препарат с хроматидным симметричным обменом, окраска красителем Гимза.*

В случае симметричных обменов хроматидного типа соматическая конъюгация поддерживает ассоциацию между хромосомами, включенными в обмен, и поэтому их можно легко наблюдать в отсутствие каких-либо процедур дифференциального окрашивания хромосом.

#### *Асимметричные и симметричные обмены*

Есть две формы симметричных и асимметричных межплечевых обменов, но при анализе метафазных клеток различим лишь один. Соматическая конъюгация позволяет наблюдать симметричный обмен.

#### *Трехплечевая конфигурация*

Трехплечевая конфигурация может быть описана как взаимодействие между одной хромосомой, имеющей изохроматидную делецию, и второй хромосомой, имеющей хроматидную делецию.

Совершенно очевидно, что это система классификации не является исчерпывающей, поскольку может возникать много типов сложных аберраций. Описаны лишь те типы, которые наблюдаются намного чаще других. Более полная классификация дана Саваджем [52].

### 6.4. ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМОСОМ

Когда делящиеся клетки вступают в митоз, хроматин конденсируется в хромосомах знакомой формы. Были разработаны методы, вызывающие конденсацию хроматина не в состоянии митоза, и это называется преждевременной конденсацией хромосом (premature chromosome condensation, PCC). Преждевременная конденсация может быть индуцирована слиянием интерфазных клеток с митотическими клетками яичника китайского хомячка (СНО) или клетками HeLa, при использовании вирус Сендай или полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве фактора, вызывающего слияние клеток [66]. Однако для слияния клеток при помощи вируса Сендай требуются клетки, мембраны которых особо восприимчивы к вирусным частицам, и имеются сообщения, что для лимфоцитов в фазе G<sub>0</sub> нельзя добиться

удовлетворительного слияния при помощи вируса Сендай. Эта трудность была преодолена для задач биологической дозиметрии благодаря использованию полиэтиленгликоля для индуцирования РСС [67].

Были также разработаны химические методы индуцирования РСС при помощи ингибиторов фосфорилирования ДНК, таких как окадаиновая кислота или каликулин-А. Для большинства из этих методов необходим клеточный цикл в культуре [68, 69].

Метод РСС, подробно описанный в Разделе 11, является очень полезным инструментом исследования процессов, происходящих сразу после облучения, и кинетики реституции разрывов хромосом и/или неправильной репарации, в результате которых образуются абберрации (т.е. дицентрики и транслокации) [70–72]. Эти исследования показывают, что дицентрики, полные и неполные транслокации и ацентрические фрагменты, которые со временем будут видны в метафазе, образовались в фазе  $G_0$  в различное время, которое зависит от дозы. При низких дозах рентгеновского излучения (1–2 Гр) как дицентрики, так и транслокации в лимфоцитах человека формируются быстро. Однако при более высоких дозах, 4 Гр и 6 Гр, частоты хромосомных обменов увеличиваются пропорционально реституции разрывов хромосом (репарации).



*РИС. 17. Преждевременная конденсация хромосом, индуцированная слиянием необлученного лимфоцита человека с митотической клеткой яичника китайского хомячка (СНО), которое опосредовано полиэтиленгликолем. Можно видеть сорок шесть четких однохроматидных РСС.*

#### 6.4.1. Методы преждевременной конденсации хромосом (РСС)

Различные методы РСС могут быть разделены на следующие группы:

*Анализ «РСС - слияние»* был первым анализом, описанным в литературе [73, 74] в 1974 г. При проведении этого анализа для индуцирования преждевременной конденсации хромосом человека выполняется слияние лимфоцитов с митотическими клетками, при этом часто используются клетки яичника китайского хомячка (СНО) [67]. При помощи этого подхода можно подсчитать число частей хромосом человека, и, следовательно, число радиационно-индуцированных хромосомных фрагментов сверх фоновой частоты. Метод также используется для оценки неравномерного облучения [75]. Главное преимущество этого метода состоит в том, что повреждения можно наблюдать вскоре после забора крови.

*Экспресс-анализ интерфазных хромосом (RICA)* позволяет выполнять визуализацию радиационно-индуцированных повреждений при помощи зондов FISH. ДНК хромосом искусственно конденсируется для идентификации хромосомных доменов и обнаружения обменов между двумя различными доменами [76–78].

*Анализ «РСС - дицентрики»* позволяет наблюдать дицентрики в других фазах клеточного цикла (главным образом, в фазе G<sub>2</sub>), а не в классической фазе М, и, следовательно, визуализировать клетки, которые при традиционном анализе дицентриков не были бы видны [79]. Это представляет особый интерес, когда количество лимфоцитов падает после облучения и когда трудно получить классические митозы. При использовании метода «РСС - слияние» можно уменьшить время между забором крови и оценкой дозы [79], однако при использовании химических методов для индуцирования РСС в большинстве лабораторий выполняют культивирование в течение 48 часов, и, следовательно, время никаким образом не сокращается.

*Анализ «РСС - кольца»* выполняет задачу визуализации радиационно-индуцированных колец в клетках на разных фазах клеточного цикла (Рис. 18).

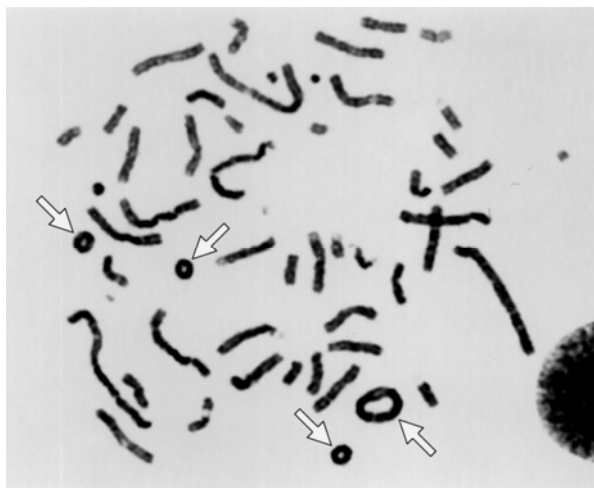


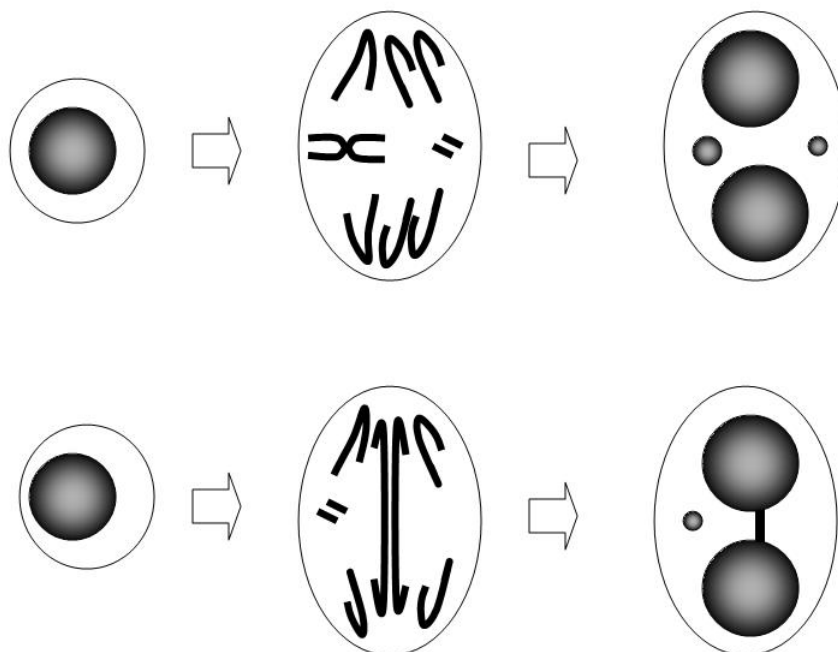
РИС. 18. Кольца РСС (стрелки) в лимфоците, взятом у пациента аварии в Токай-мура (см. Раздел 11.3).

Основное преимущество этого подхода состоит в том, что он позволяет измерять намного более высокие дозы, чем классический анализ дицентриков, поскольку насыщенность числа колец проявляется лишь при дозах выше 20 Гр для излучения с низкой ЛПЭ [70, 80, 81].

## 6.5. МИКРОЯДРА

Микроядра образуются из фрагментов запаздывающих хромосом или целых хромосом в анафазе, которые не включены в ядра дочерних клеток (Рис. 19А, В). Поэтому они наблюдаются как выражено отдельные небольшие сферические объекты, имеющие ту же самую морфологию и свойства окрашивания ядер, в цитоплазме дочерних клеток [82].

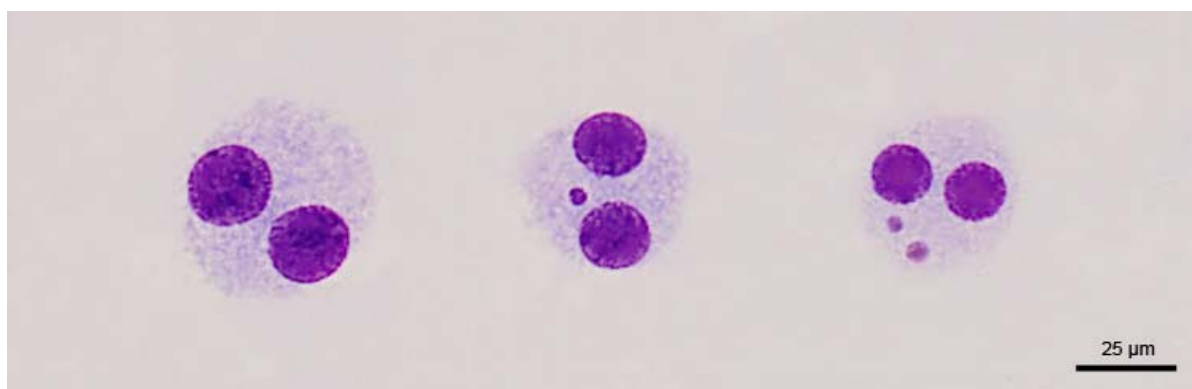
### Образование микроядра



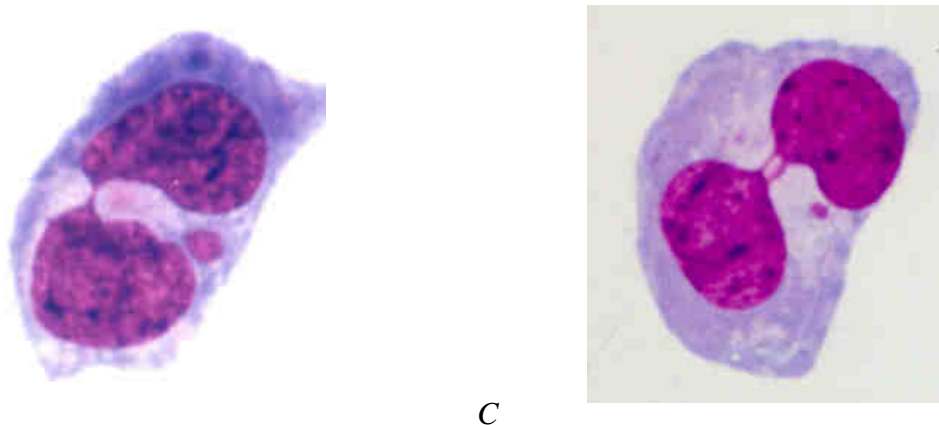
ТЕСТ С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА  
С ЦИТОХАЛАЗИНОМ-В

### Образование нуклеоплазматического моста

A



B



*РИС. 19. (А) Схематическая диаграмма, показывающая механизм образования микроядер и нуклеоплазматических мостов при микроядерном тесте с блокированием цитокинеза. (В) Примеры двухъядерных клеток без микроядер, с одним и с двумя микроядрами. (С) Примеры двухъядерных клеток с одним и с двумя нуклеоплазматическими мостами; в каждом случае нуклеоплазматический мост сопровождается микроядром.*

В середине 1980-ых годов была внедрена очень важная техническая инновация. Это был метод блокирования цитокинеза в культуральных лимфоцитах путем добавления цитохалазина-В (Cyt-B) в среду, без ингибирования деления ядер. При блокировании цитокинеза [83, 84] две дочерние клетки не разделяются, а образуются двухъядерные клетки. Следовательно, при использовании этого протокола можно различать пролиферирующие (после первого митоза) и непролиферирующие клетки и специфически подсчитывать микроядра в клетках, способных к экспрессии микроядер, то есть в двухъядерных клетках. Модифицированный анализ позволяет идентификацию и количественное определение микроядер в двухъядерных клетках с сохраненной цитоплазмой (Рис. 19В).

Подсчет микроядер в двухъядерных клетках можно далее усовершенствовать путем использования центромерных зондов, которые позволяют отличать микроядра, происходящие из ацентрических фрагментов хромосом, от микроядер, происходящих из целых хромосом [85, 86].

Современный уровень автоматизации подсчета микроядер открыл новые возможности использования этого анализа при радиационных событиях с большим числом пострадавших и для рутинного биомониторинга [87] (Раздел 13.3.3).

В настоящее время микроядерный тест с блокированием цитокинеза развивался также в цитомный анализ, при котором может быть оценен целый спектр хромосомных повреждений, включая разрывы, асимметричную перестройку хромосом, потерю и нерасхождение хромосом, а также некроз, апоптоз и цитостаз [86]. Этот метод также специфически используется для подсчета нуклеоплазматических мостов (NPB) (Рис. 19А, С), суррогатного биомаркера дицентрических хромосом, которые образуются либо из слияния концов теломер, либо из неправильной репарации двухнитевых разрывов ДНК [86]. Таким образом, нуклеоплазматические мосты, подсчитанные при цитомном анализе с блокированием цитокинеза, можно также использовать для биологической дозиметрии облучения ионизирующим излучением [88]. Между нуклеоплазматическими мостами, дицентрическими хромосомами и центрическими кольцами наблюдалась сильная корреляция и схожие кривые доза-эффект [89].

Подробная информация об микроядерном тесте и цитомном анализе дана в Разделе 12.



## 7. ВЗЯТИЕ КРОВИ

### 7.1. ВЫБОР ВРЕМЕНИ

Пробу крови из вены, предпочтительно объемом 10 мл, можно брать в течение нескольких часов после радиационного облучения всего тела. Однако в случае частичного облучения тела или неравномерного облучения лимфоциты в циркуляционном и экстравазальном пулах достигают равновесия лишь приблизительно через 24 часа [90]. Это может привести к непредставительной пропорции облученных клеток в пробе крови, и поэтому рекомендуется отложить взятие крови по крайней мере до следующего дня. Необходимо принять меры к тому, чтобы обеспечить оперативное получение пробы крови, поскольку даже если гематологические параметры пациента остаются в пределах нормы по истечении приблизительно четырех недель, выходы аберраций начинают падать, что повышает неопределенность любых оценок дозы облучения [91].

В случае серьезного переоблучения, когда есть вероятность сильного падения содержания лейкоцитов, существует «временное окно» продолжительностью, возможно, лишь несколько часов или дней, до того как содержание лимфоцитов упадет до уровня, при котором невозможно получить достаточное количество клеток для цитогенетического анализа. Если лечение включает переливание цельной крови или фракций крови, важно получить пробу крови пациента до начала лечения. Из научных соображений лаборатории следует попытаться получить последовательность проб крови через короткие интервалы. Это этически приемлемый подход, поскольку такое взятие крови будут производить с целью наблюдения за изменениями в дифференциальном количестве лейкоцитов.

Возможность оперативного культивирования клеток может предоставляться не всегда, например, если взятие крови происходит в отдаленной местности с плохой связью. Можно обеспечить сохранность образцов крови в охлажденном состоянии, но потеря жизнеспособности лимфоцитов быстро становится большой проблемой [92]. Эта проблема решается путем стимуляции лимфоцитов фитогемоагглютинином (ФГА) сразу после взятия крови из вены и выдержки их в охлажденном состоянии (ниже 20°C), с тем чтобы не происходило трансформации лимфоцитов и развития клеточного цикла до тех пор, пока клетки не нагреются до 37°C. Описанный ниже метод, который был разработан М.С.Саки (личное сообщение), позволяет выращивать культуру клеток с задержкой вплоть до двух недель:

- 1) Подготовить заранее стерильные 10-миллилитровые пробирки, содержащие 5 мл среды Лейбовица L-15 с 20%-ой фетальной бычьей сывороткой и 4% обезвоженного ФГА (среда Лейбовица L-15 важна для долгосрочной транспортировки, поскольку 10-кратно большее содержание аминокислот в L-15, по сравнению с другими распространенными питательными средами, обеспечивает хорошую буферизацию, и ее значение pH устойчиво в течение длительного времени).
- 2) Взять пробу крови в обычную гепаринизированную пробирку.
- 3) Поместить 5 мл гепаринизированной крови в пробирку со средой L-15 и перемешать.
- 4) Держать пробирки в охлажденном состоянии (<20°C); при этом условии их можно хранить или отправлять в лабораторию без значительного снижения жизнеспособности.
- 5) Далее клетки отмываются в обычной среде и обрабатываются по той же методике, которая описана ниже в Разделе 9.1 для традиционных культур.

Если используется методика со средой Лейбовица, то ее необходимо валидировать с использованием кривой доза-эффект, полученной при таких же условиях.

## 7.2. АНТИКОАГУЛЯНТ

В качестве антикоагулянта для культур лимфоцитов обычно используется не содержащий консервантов литий-гепарин, хотя можно использовать натрий-гепарин или аммоний-гепарин. Другие широко доступные антикоагулянты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), часто ухудшают рост клеток, и использовать их не следует. Если проба крови была получена в неправильном антикоагулянте, желательно запросить новую пробу. Однако такая возможность не всегда может представиться, и в такой ситуации возможно «спасти» пробу путем отмывки. Для этого взять 4 мл крови, добавить 6 мл сбалансированного солевого раствора (раствор Хенкса или раствор Эрла) или культуральную среду и центрифугировать при 600g в течение 3-5 минут. Удалить супернатант, добавить 10 мл свежей промывочной жидкости к клеточной массе и снова центрифугировать. После окончательного удаления супернатанта отмывые клетки могут быть восстановлены до первоначального объема крови путем добавления культуральной среды, содержащей 10%-ую фетальную бычью сыворотку. Далее культуры клеток могут быть поставлены как описано ниже в Разделе 9.1, и с отмывым образцом обращаются так, как если бы это была нормальная проба крови.

## 7.3. КОНТЕЙНЕРЫ

Целый ряд компаний производят одноразовые стеклянные или пластмассовые пробирки, содержащие надлежащее количество литий-гепарина. Можно использовать традиционные пробирки с отвинчивающейся крышкой и вакуумные пробирки. Они должны быть стерильны, и многие производители обычно поставляют их стерильными, но это следует подтвердить. Следует избегать пробирок, содержащих стеклянные или пластмассовые бусинки или гели. Если используется высушенный гепарин, необходимо должным образом перемешать кровь, переворачивая пробирку несколько раз. Желательно, чтобы цитогенетическая лаборатория прислала образец пробирки из своих запасов. В частности, это дает возможность включать подробный набор инструкций для врача и послать надлежащую упаковку с соответствующим адресом для возвращения пробы.

## 7.4. ТРАНСПОРТИРОВКА

Во время транспортировки следует поддерживать пробы крови идеально в диапазоне от 18°C до 24°C. Если есть вероятность значительного выхода температуры за пределы этого диапазона, рекомендуется обеспечить охлаждающие или термостатические пакеты для поддержания комнатной температуры и регистраторы температуры. В любом случае следует избегать замораживания проб во время транспортировки.

При транспортировке проб крови следует соблюдать требования соответствующих национальных и/или международных регламентов по перевозке инфекционных материалов, как изложено в действующих Рекомендациях ВОЗ по правилам перевозки инфекционных материалов [93]. В этом документе грузоотправителям также объясняется, как классифицировать, регистрировать, маркировать, наклеивать бирки и упаковывать инфекционные или потенциально инфекционные материалы, такие как диагностические пробы крови.

Для транспортировки проб крови можно использовать стандартные стеклянные или пластиковые пробирки с литий-гепарином. Они должны быть помещены в твердый противоударный и водонепроницаемый вторичный контейнер. Этот контейнер должен также содержать амортизационный материал и достаточное количество впитывающего материала для поглощения всего содержимого, но ни в коем случае не охлаждающие пакеты. Далее вторичный контейнер должен быть помещен во внешнюю упаковку,



например, в крепкую картонную коробку, и должна быть нанесена соответствующая маркировка. Пересылка в диагностических целях проб крови, которые, насколько известно, не содержат патогенов, маркируется как «UN 3373. BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B» («ООН 3373. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО, КАТЕГОРИЯ В»). Поэтому маркировка должна содержать эти слова и знак белого ромба с черными буквами «UN 3373» («ООН 3373»). Кроме того, на посылке должны быть указаны название, адрес и номер телефона отправителя; название, адрес и номер телефона получателя; и номер телефона ответственного лица, осведомленного о посылке [93].

Если чувствуется необходимость в охлаждающем пакете или термостатическом пакете для поддержания комнатной температуры, их следует размещать снаружи вторичного контейнера, а внешняя упаковка должна быть выполнена из теплоизоляционного материала, например, пенополистрола. Упаковочные комплекты, отвечающие этим требованиям, выпускаются серийно.

Для международных грузов грузоотправители должны получить все необходимые разрешения на экспорт или импорт, а лабораторию-получатель следует уведомить до отгрузки проб, с тем чтобы она успела получить лицензию на импорт, если таковая требуется. Часто бывает удобно использовать международную курьерскую компанию, которая обеспечивает оперативную услугу «от двери до двери» и сама занимается таможенным оформлением и т.д.

Два или три дня перевозки являются приемлемым сроком, однако для проб крови требуется специальная служба доставки, с тем чтобы избежать длительных задержек, например, в связи с национальными праздниками.

При авиаперевозках кровь не должна проходить через рентгеновские аппараты систем безопасности. Если имеется вероятность такого досмотра, в упаковку следует поместить кусок рентгеновской пленки, стандартный термолюминесцентный дозиметр (ТЛД) или контрольную карточку оптически стимулированной люминесценции (ОСЛ). На упаковке должен быть помещен текст «DO NOT X-RAY» («НЕ ПРОСВЕЧИВАТЬ РЕНТГЕНОМ»). Это же условие должно быть указано в сопроводительных документах.



## 8. ПОЛУЧЕНИЕ КРИВОЙ ДОЗА-ЭФФЕКТ *IN VITRO*

### 8.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Несмотря на совершенствование методов и принятие различными специалистами более сопоставимых статистических программ для анализа данных, все еще остаются различия между калибровочными кривыми различных лабораторий. Интерпретация дозы при помощи калибровочной кривой, полученной в другом месте, может внести дополнительную неопределенность, и поэтому необходимо рекомендовать, чтобы любая лаборатория, намеревающаяся выполнять биологическую дозиметрию, создала свои собственные данные доза-эффект [94].

Большинство аварийных переоблучений связано с источниками гамма-излучения, но есть также значительное количество событий, связанных с рентгеновским излучением. Установлено, что калибровка для этих двух излучений с низкой линейной передачей энергии различна, особенно для низких доз. Таким образом, для лаборатории, приступающей к программе биологической дозиметрии, прежде всего необходимо получить кривую доза-эффект для этих видов излучения. К счастью, события, связанные с облучением нейтронами, редки, но следует принять во внимание возможность того, что к лаборатории обратятся в связи с аварией с возникновением критичности. В этом случае потребуется калибровочная кривая для нейтронов спектра деления.

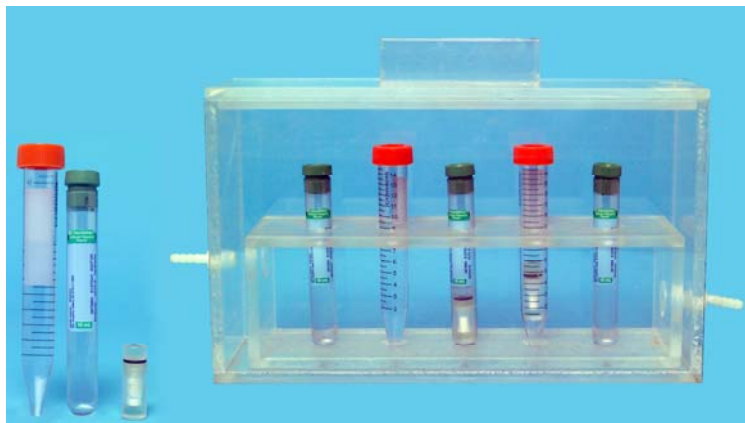
Лимфоциты должны быть облучены *in vitro* таким образом, чтобы максимально приблизиться к ситуации *in vivo*, и когда это сделано, получают зависимость доза-эффект [95]. Следует взять свежеполученные образцы крови в литий-гепариновых пробирках и облучить их как цельную кровь при температуре 37°C. После облучения они должны выдерживаться в течение 2 часов при температуре 37°C, затем выращиваться стандартным методом, идентичном тому, который используется для количественного анализа дицентриков, транслокаций или микроядер на пробах, взятых у пациентов с подозрением на переоблучение.

### 8.2. ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

При подготовке кривой доза-эффект необходимо опираться на достоверную и точную физическую дозиметрию, и здесь следует учитывать ряд моментов. Кровь необходимо поместить таким образом, чтобы можно было легко вывести дозу, а расстояние крови от источника должно быть достаточно удаленным для того, чтобы облучение можно было считать равномерным. Например, если проба имеет толщину 1 см, то она должна находиться от источника на расстоянии по крайней мере 1 м, с тем чтобы различие в дозе между передней и задней стороной было меньше 2%. Для обеспечения равновесия заряженных частиц необходимо обеспечить достаточное количество материала, окружающего кровь. Для гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$  достаточно 4 мм плотного материала; для 250 кВп рентгеновского излучения необходим лишь 1 мм. Для нейтронов 1 мм обычно также достаточен.

Количество окружающих материалов следует уменьшить до минимума, чтобы избежать осложнений, связанных с рассеянным излучением. Эти материалы должны иметь атомный состав, аналогичный крови, поскольку доза в крови, прилегающей к стенке контейнера образца, будет создаваться электронами, являющимися результатом взаимодействий в этой стенке. Серьезное расхождение в атомном составе приведет к неравномерному облучению клеток. Для рентгеновского и гамма-излучения электронная плотность является главным фактором при рассмотрении этого расхождения, в то время как для нейтронов важны атомные компоненты, поскольку нейтроны взаимодействуют с ядрами атомов-мишеней.

Схема облучения должна быть калибрована путем физических измерений, и для этого, как правило, используется ионизационная камера, но можно использовать и другие методы. На Рис. 20 показан пример схемы измерений с использованием аланина.



*РИС. 20. Облучательный комплект, используемый для установки и выдержки пробирок объемом 15 мл и вакутейнеров объемом 10 мл для выполнения облучения гамма-источниками. Коробка-контейнер комплекта выполнена из плексигласа с толщиной стенки 6 мм, предусмотренной как часть конструкции для обеспечения равновесия заряженных частиц. Коробка-контейнер также имеет отверстия для доступа с обоих концов, что позволяет протекание воды циркулирующей водяной бани (не показана) для поддержания температуры содержимого на уровне в 37°C во время облучения. На снимке показаны также пробирки и вакутейнеры, заполненные водой, или флаконы с аланином, используемые для дозиметрических измерений [97] (с разрешения AFRRI, США).*

Детектор физического дозиметра должен быть окружен материалом, эквивалентным тому, который окружает кровь. По возможности, он должен иметь размеры, аналогичные пробе крови, с тем чтобы он мог заменить пробу для целей дозиметрии. Физический дозиметр обычно калибруют в воздушной керме в греях, и он должен обладать прослеживаемостью по отношению к национальному эталону. Коэффициент пересчета в греи в мягкой ткани представляет собой отношение массовых коэффициентов поглощения энергии. Численно его получают путем умножения значения кермы на коэффициент 1,09 для 250 кВ пикового напряжения рентгеновского излучения и 1,10 для гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$ . Таким образом, этот коэффициент зависит от энергии и имеет более низкое значение при более низких энергиях. Коэффициенты пересчета имеют различное значение для мягких тканей и для крови, но для излучения с низкой ЛПЭ этот коэффициент весьма мал и может игнорироваться. Для нейтронов он может приближаться к 5%. Коэффициент калибровки учитывает любое поглощение стенкой ионизационной камеры, но часто оказывается необходимым корректировать мощность дозы вследствие самопоглощения кровью.

Обычный метод определения дозы состоит в пересчете измеренного значения воздушной кермы в поглощенную дозу в ткани или крови, с последующим пересчетом, по мере необходимости, на расстояние (обратно-пропорционально квадрату), поглощение и различие материала на границе крови. Размер и общая геометрия установки представляют собой компромисс между этими факторами, поскольку чем меньше образец крови, тем меньше корректировка на поглощение и тем больше корректировка на различие материала. Как бы то ни было, геометрию и материалы следует выбирать таким образом, чтобы минимизировать необходимые корректировки.

Для получения калибровочной кривой *in vitro*, применимой к случаям острого аварийного облучения, мощность дозы следует выбирать такой, чтобы все дозы выдавались менее чем за 15 минут. Тогда различия во времени доставки между различными дозами будут достаточно малы для того, чтобы влияние на  $\beta$  или на произведение квадрата дозы на коэффициент выхода было не больше, чем приблизительно 4%. Кроме того, некоторые исследователи предпочитают выполнять калибровку для неострых случаев, чтобы иметь лучшее понимание того, как необходимо изменять коэффициент  $\beta$  для интерпретации выхода аберраций, которые возникли в результате аварий, связанных с продолжительным облучением. Еще более важно требование, чтобы такие калибровки выполнялись при температуре 37°C. В случае выполнения калибровки при комнатной температуре репарация во время облучения будет небольшая или ее вообще не будет, поэтому полученная кривая доза-эффект будет такой же, как при остром облучении. Важно помнить, что критическим фактором при калибровке растягивания дозы во времени является время облучения, а не мощность дозы. Поэтому каждая точка данных должна быть от крови, облученной в течение одного и того же времени. Это достигается путем изменения расстояния от источника, что, разумеется, требует проведения намного большего количества физических измерений для калибровки. Для более легкой альтернативы, когда используется постоянная мощность дозы, и, следовательно, единственное положение облучения, требуется различное время прохождения для каждой дозы, и полученные данные не будут столь хорошо согласованы с линейно-квадратичным уравнением доза-эффект [96].

Некоторые лаборатории для калибровки предпочитают помещать пробу крови в фантом на том основании, что до некоторой степени принимается во внимание рассеяние в теле человека (Figs 20 и 21).

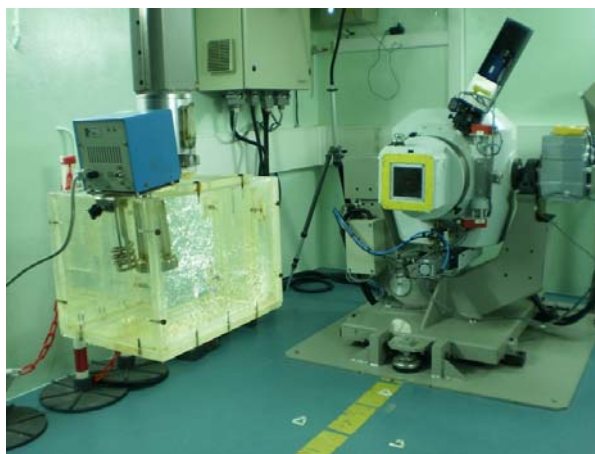


РИС. 21. Водяная баня, нагретая до температуры 37°C, установлена перед источником гамма-излучения кобальт-60. Для достижения электронного равновесия, проба крови помещена в плексигласовый держатель.

Однако в значительно большей мере необходимо учитывать перечисленные выше дозиметрические поправочные коэффициенты и рассматривать вопрос, можно ли помещать ионизационную камеру вблизи пробы крови. Обычно в качестве фантома используют воду, при этом ее температура должна поддерживаться на уровне 37°C. Если установить ионизационную камеру в ту же геометрию что и пробу крови, то таким образом будет учитываться доза от рассеянного излучения. При использовании теплой воды потребуются значительные корректировки по температуре и давлению, и, разумеется, не допускается попадание влаги на камеру. Особенно проблематично выполнение калибровки по нейтронам в фантоме. Для фантома предпочтителен материал, эквивалентный ткани, а не

вода. Таким образом получают спектр излучения, родственный спектру тела, с возможным значительным усилением составляющей с низкой ЛПЭ в дозе в лимфоцитах. Определение спектра различных составляющих в общей поглощенной дозе может быть весьма затруднительно.

### 8.3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Как рассматривалось в Разделе 3, имеются очень убедительные доказательства того, что выходы хромосомных aberrаций или микроядер (Y) связаны с дозой (D) линейно-квадратичным уравнением

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

или, для излучения с высокой ЛПЭ, член  $\alpha$  становится большим, и в результате член  $\beta$  становится биологически менее значимым, а также статистически «замаскированным», и доза-эффект аппроксимируется линейным уравнением

$$Y = C + \alpha D \quad (4)$$

Цель подбора кривой состоит в том, чтобы определить те значения коэффициентов C,  $\alpha$  и  $\beta$ , которые лучше всего соответствуют точкам данных. Для дицентриков облучение рентгеновскими или гамма-лучами дает распределение повреждений, которое очень хорошо представлено распределением Пуассона [98]. В то же время нейтроны и другие виды излучения с высокой ЛПЭ дают распределения, которые показывают избыточную дисперсию, где дисперсия ( $\sigma^2$ ) превышает среднее значение ( $y$ ). Является ли отношение дисперсии к среднему ( $\sigma^2/y$ ) функцией дозы, в настоящее время это нерешенный вопрос. Для микроядер данные часто имеют избыточную дисперсию при всех дозах, даже при облучении фотонами.

Поскольку методы подбора кривой основаны на статистике Пуассона, распределение дицентрических клеток следует проверять на соответствие распределению Пуассона для каждой дозы, используемой для построения калибровочной кривой. В настоящее время наиболее широко используемым критерием является  $u$ -критерий [99, 100]. Статистика  $u$ -критерия является нормализованной единицей измерения показателя дисперсии ( $\sigma^2/y$ ), который для распределения Пуассона должен быть равен единице. Значения  $u$ , превышающие 1,96, указывают на избыточную дисперсию (с двухсторонним уровнем значимости  $\alpha = 0,025$ ).

$$u = (\sigma^2/y - 1) \sqrt{\frac{N - 1}{2(1 - 1/X)}} \quad (5)$$

где:

$N$  - число проанализированных клеток,

$X$  - число обнаруженных дицентриков (или дицентриков плюс кольца).

Значения  $u < -1,96$  указывают на избыточную дисперсию. С биологической точки зрения избыточная дисперсия весьма маловероятна, поэтому значения  $u$  меньше -1,96 могут указывать на проблему в осуществлении выборки данных.

Для надлежащего подбора кривой требуется достаточное число степеней свободы, с тем чтобы минимизировать ошибку на кривой. Идеально следует использовать 10 или больше доз в диапазоне 0,25–5,0 Гр. Для излучения с низкой ЛПЭ нет необходимости иметь данные выше чем приблизительно 5,0 Гр, и, действительно, есть доказательства, что выше этой дозы наблюдается насыщенность выхода aberrаций, что приводит к искажению коэффициента  $\beta$  [101]. Для излучения с высокой ЛПЭ предложено максимальное значение 2,0 Гр.

Поскольку большинство радиационных аварий связано с дозами меньше 1,0 Гр, нижняя часть кривой особенно важна для оценки доз. Поэтому следует приложить существенные усилия для того, чтобы уменьшить статистическую неопределенность, связанную с коэффициентом выхода  $\alpha$ . Предложено, чтобы несколько калибровочных доз, не менее четырех, находились в диапазоне 0,25–1,0 Гр. Если лаборатория способна получать данные для доз ниже 0,25 Гр, то наличие таких данных весьма желательно. В случае более высоких доз при подсчете следует стремиться обнаруживать 100 дицентриков для каждой дозы. Однако при более низких дозах этого трудно достигнуть, и вместо этого приходится подсчитывать несколько тысяч клеток на точку; предлагается диапазон от 3000 до 5000 клеток. Во всех случаях фактическое число подсчитанных клеток должно зависеть от числа точек дозы в области низкой дозы, с тем чтобы уменьшить ошибку на подобранной кривой. В Таблице 4 приведен образец данных, использованных для построения кривых доза-эффект для гамма-излучения с низкой ЛПЭ и альфа-излучения с высокой ЛПЭ.

ТАБЛИЦА 4. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРОБ КРОВИ, ОБЛУЧЕННЫХ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЕМ И ЧАСТИЦАМИ ГЕЛИЯ-4 [102, 103]

| γ- излучение<br>(кобальт-60) |      |     |                                      |    |    |   |   |   |   |  |                   |        |
|------------------------------|------|-----|--------------------------------------|----|----|---|---|---|---|--|-------------------|--------|
| доза (Гр)                    | N    | X   | распределение дицентриков по клеткам |    |    |   |   |   |   |  | σ <sup>2</sup> /y | u      |
|                              |      |     | 0                                    | 1  | 2  | 3 | 4 | 5 | 6 |  |                   |        |
| 0,000                        | 5000 | 8   | 4992                                 | 8  |    |   |   |   |   |  | 1,00              | -0,07  |
| 0,100                        | 5002 | 14  | 4988                                 | 14 |    |   |   |   |   |  | 1,00              | -0,13  |
| 0,250                        | 2008 | 22  | 1987                                 | 20 | 1  |   |   |   |   |  | 1,08              | 2,61   |
| 0,500                        | 2002 | 55  | 1947                                 | 55 |    |   |   |   |   |  | 0,97              | -0,86  |
| 0,750                        | 1832 | 100 | 1736                                 | 92 | 4  |   |   |   |   |  | 1,03              | 0,79   |
| 1,000                        | 1168 | 109 | 1064                                 | 99 | 5  |   |   |   |   |  | 1,00              | -0,02  |
| 1,500                        | 562  | 100 | 474                                  | 76 | 12 |   |   |   |   |  | 1,06              | 1,08   |
| 2,000                        | 332  | 103 | 251                                  | 63 | 17 | 2 |   |   |   |  | 1,14              | 1,82   |
| 3,000                        | 193  | 108 | 104                                  | 72 | 15 | 2 |   |   |   |  | 0,83              | --1,64 |
| 4,000                        | 103  | 103 | 35                                   | 41 | 21 | 4 | 2 |   |   |  | 0,88              | -0,84  |
| 5,000                        | 59   | 107 | 11                                   | 19 | 11 | 9 | 6 | 3 |   |  | 1,15              | 0,81   |
| Среднее                      |      |     |                                      |    |    |   |   |   |   |  | 1,0               |        |

| Частицы <sup>4</sup> He 20 МэВ |      |     |                                      |     |    |    |   |   |   |   |                   |       |
|--------------------------------|------|-----|--------------------------------------|-----|----|----|---|---|---|---|-------------------|-------|
| доза (Гр)                      | N    | X   | распределение дицентриков по клеткам |     |    |    |   |   |   |   | σ <sup>2</sup> /y | u     |
|                                |      |     | 0                                    | 1   | 2  | 3  | 4 | 5 | 6 | 7 |                   |       |
| 0,000                          | 2000 | 3   | 1997                                 | 3   |    |    |   |   |   |   | 1,00              | -0,04 |
| 0,051                          | 900  | 19  | 881                                  | 19  |    |    |   |   |   |   | 0,98              | -0,44 |
| 0,104                          | 1029 | 27  | 1004                                 | 23  | 2  |    |   |   |   |   | 1,12              | 2,84  |
| 0,511                          | 1136 | 199 | 960                                  | 154 | 21 | 1  |   |   |   |   | 1,07              | 1,60  |
| 1,010                          | 304  | 108 | 217                                  | 69  | 15 | 3  |   |   |   |   | 1,09              | 1,15  |
| 1,536                          | 142  | 96  | 75                                   | 40  | 25 | 2  |   |   |   |   | 0,98              | -0,20 |
| 2,050                          | 137  | 120 | 63                                   | 44  | 16 | 12 | 2 |   |   |   | 1,20              | 1,65  |
| 2,526                          | 144  | 148 | 66                                   | 34  | 25 | 14 | 3 | 2 |   |   | 1,40              | 3,40  |
| 3,029                          | 98   | 108 | 47                                   | 16  | 17 | 17 | 0 |   |   | 1 | 1,56              | 3,93  |
| Среднее                        |      |     |                                      |     |    |    |   |   |   |   | 1,19              |       |

Для каждой проанализированной дозы представлено общее количество подсчитанных клеток (N), общее количество наблюдаемых дицентриков (X), распределение клеток дицентриков и индекс дисперсии ( $\sigma^2/y$ ) и значения u-критерия (u). Значения u-критерия, превышающие 1,96, указывают на избыточную дисперсию.

Для определения коэффициентов наилучшего соответствия предлагается метод максимальной вероятности [104, 105]. При использовании этого метода было достигнуто значение наилучшего соответствия для каждого коэффициента, при этом принималось распределение Пуассона и максимальная вероятность наблюдений методом наименьших квадратов с итерационным перевзвешиванием. Для распределения с избыточной дисперсией (непуассоновского), которое получают после излучения с высокой ЛПЭ, в весах необходимо учитывать избыточную дисперсию. Если данные показывают статистически существенный тренд  $\sigma^2/y$  с возрастанием дозы, то этот тренд следует использовать. Иначе пуассоновский вес каждой точки данных необходимо делить на среднее значение  $\sigma^2/y$ .

Согласие кривой и значимость подобранных коэффициентов  $\alpha$  и  $\beta$  необходимо проверять, например, при помощи критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и соответствующей формы  $F$ -критерия (например,  $F$ -критерий,  $z$ -критерий или  $t$ -критерий), соответственно. Эти критерии детально описаны в Приложении VI. При наличии доказательств отсутствия согласия (т.е.  $\chi^2$  превышает число степеней свободы (df)), стандартную ошибку (SE) следует увеличить на  $(\chi^2/df)^{1/2}$ . Многие компьютерные программы вычисляют значение SE на основании суммы квадратов, а не на пуассоновской оценке дисперсии, что приводит к ложной недооценке пуассоновской ошибки. Поэтому при вычислении SE при помощи указанного метода и при значении df, превышающем  $\chi^2$ , рекомендуется увеличивать SE на  $(df/\chi^2)^{1/2}$ .

В Таблице 5 приведены подобранные коэффициенты для случая использования данных из Таблицы 4, и вычислены стандартные ошибки (SE), исходя из распределения Пуассона.

ТАБЛИЦА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДБОРА ДАННЫХ О ДИЦЕНТРИКАХ ИЗ ТАБЛИЦЫ 4

| $\gamma$ -излучение<br>(кобальт-60) |   |   |                     |    |
|-------------------------------------|---|---|---------------------|----|
| C $\pm$ SE                          | $\alpha$ ( $\Gamma p^{-1}$ ) $\pm$ SE               | $\beta$ ( $\Gamma p^{-2}$ ) $\pm$ SE              | $\chi^2$            | df |
| 0,00128 $\pm$ 0,00047               | 0,02103 $\pm$ 0,00516<br>$F = 4,08$ , $p < 0,03$    | 0,06307 $\pm$ 0,00401<br>$F = 15,73$ , $p < 0,01$ | 6,61<br>$p = 0,58$  | 8  |
| Частицы $^4\text{He}$ 20 МэВ        |   |   |                     |    |
| C $\pm$ SE                          | $\alpha$ ( $\Gamma p^{-1}$ ) $\pm$ SE               | $\beta$ ( $\Gamma p^{-2}$ ) $\pm$ SE              | $\chi^2$            | df |
| 0,00143 $\pm$ 0,00093               | 0,32790 $\pm$ 0,02875<br>$F = 11,41$ , $p < 0,01$   | 0,02932 $\pm$ 0,01636<br>$F = 1,79$ , $p = 0,25$  | 7,40<br>$p = 0,39$  | 6  |
| 0,00193 $\pm$ 0,00097               | 0,37290 $\pm$ 0,01787<br>$F = 20,87$ , $p^1 < 0,01$ |   | 10,91<br>$p = 0,14$ | 7  |

<sup>1</sup>  $F_{.05 [7, 7]} = 3,77$

Значения  $p$  критерия  $\chi^2$ , показанные в Таблице 5, указывают на то, что подобранные точки данных статистически не отличались от наблюдаемых, что подтверждает хороший подбор. Кроме того, значимость линейных и квадратичных коэффициентов была также подтверждена  $F$ -критерием, отношением между каждым коэффициентом и его стандартной ошибкой (SE); для каждого коэффициента значение  $F$  было выше 3,44 (значение отсечки для  $F_{.05 [8, 8]}$ ), а значение  $z$  было выше 1,96 (значение отсечки для нормального распределения; оба значения можно найти в стандартных таблицах).  $F$ -критерий, описанный в Приложении VI, является отношением двух хи-квадратичных распределений, а  $F_{.05 [8, 8]}$  означает значение отсечки для  $\alpha = 0,05$  для 8 степеней свободы



для числителя и 8 степеней свободы для знаменателя. Для частиц  $^4\text{He}$  веса были уменьшены на среднее значение  $\sigma^2/y$ , 1,19. Коэффициент  $\beta$  линейно-квадратичной функции был незначительным (значение отсечки для  $F_{.05 [6, 6]} = 4,28$ );  $z$ -критерий  $p = 0,12$ ), и поэтому представлен также линейный подбор.

Существуют различные мнения о том, как рассматривать фоновый уровень аберраций при подборе данных о дозе-эффекте. Обычно используют три подхода: точку дозы 0 Гр включают в процедуру подбора кривой, точку нулевой дозы игнорируют или точку нулевой дозы представляют в каждой процедуре подбора стандартным фоновым значением. Если измеренный выход при нулевой дозе используется в качестве одной из точек данных для подбора кривой (как использовался при подборе кривой, представленной выше), фон становится переменным параметром. Однако поскольку выход в необлученных клетках обычно низок, часто не наблюдается ничего, поэтому измеренный выход при нулевой дозе равен нулю. Как рассматривалось выше, при низких дозах статистическое разрешение точек данных вообще низко. Таким образом, включение точки нулевой дозы в процедуру подбора кривой может иногда приводить к отрицательным оценкам фонового значения ( $C$ ) и отрицательным линейным коэффициентам ( $\alpha$ ), для чего, совершенно очевидно, нет никаких биологических оснований. Некоторые исследователи решают эту проблему, игнорируя точки данных нулевой дозы и проводя кривую через начало координат. Однако имеется достаточно опубликованных данных по пациентам, подвергавшихся воздействию лишь фонового излучения, чтобы показать наличие небольшого положительного фонового уровня аберраций. Поэтому некоторые исследователи приняли альтернативный метод, заключающийся в использовании небольшого положительного фонового значения в качестве точки данных и назначении ему большого процента неопределенности. Идеально лаборатории следует произвести свои собственные фоновые данные, хотя для этого требуется анализ многих тысяч клеток. Было достигнуто согласие, что фоновый уровень дицентриков составляет ~0,5–1,0 на 1000 клеток [106], в то время как для транслокаций [107] и микроядер [108] контрольные значения выше.

Имеется несколько программ, которые можно использовать для подбора кривой, таких как компьютерная программа пуассоновского метода наименьших квадратов с итерационным перевзвешиванием (PIRLS) для аддитивных, мультипликативных, степенных и нелинейных моделей, разработанная Петерсоном [109] или использование компьютерных статистических R-инструментов<sup>2</sup>. Это должно быть объединено со стандартной программой, написанной конкретно для подбора кривой, которая приведена в Приложении VI-3 настоящей публикации. Кроме того, в самом радиационно-цитогенетическом сообществе в последнее время было разработано много специализированных компьютерных программ для подбора кривых [110]. В программе SABAS [111] используются методы максимальной вероятности для подбора калибровочных данных для линейно-квадратичного уравнения. Программа Dose Estimate [112] является аналогичным инструментом, и она позволяет выполнять как линейно-квадратичный, так и линейный подбор. Кроме подбора кривых, программы SABAS и Dose Estimate имеют дополнительные инструменты помогающие обрабатывать данные случаев радиационных аварий, с тем чтобы получать оценки дозы для условий, не связанных с недавним острым облучением и облучением всего тела. Они охватывают диапазон вычислений, рассматриваемых ниже в Разделе 9.7.

При использовании вышеуказанных программ или какого-либо другого программного обеспечения, программа должна давать достаточную информацию относительно используемых методов и обеспечивать детали относительно дисперсии и ковариаций для

---

<sup>2</sup> R – бесплатная программная среда для статистических вычислений, она доступна для скачивания с <http://www.r-project.org/>

подобранных коэффициентов, поскольку они требуются для вычисления неопределенности оценки дозы (Разделе 9.7.3).

## 9. АНАЛИЗ ДИЦЕНТРИКОВ

Текст данного Раздела относительно клеточной культуры, фиксации и окрашивания препаратов написан в контексте анализа дицентриков, но большая часть материала также относится к другим анализам, рассматриваемым в настоящей публикации. Поскольку процедуры здесь рассмотрены полностью, то в разделах, относящихся к другим анализам, необходимо просто остановиться на тех деталях, которые отличаются от процессов для дицентриков.

Вкратце, важные различия состоят в следующем:

- (a) для анализа дицентриков используются двухдневные культуры, а для микроядерного теста и/или анализа нуклеоплазматических мостов (микроядерный цитомный тест с блокированием цитокинеза (CBMN Cyt) срок выращивания культур увеличен до трех дней.
- (b) для преждевременной конденсации хромосом при митотическом слиянии клеток не требуется выращивания клеток, а для методов химического индуцирования обычно требуется.
- (c) для анализа дицентриков и других анализов на метафазах необходимо блокирование митотического цикла при помощи колцемида, а для анализа CBMN Cyt этого не требуется.
- (d) вместо этого для анализа CBMN Cyt требуется блокирование цитокинеза при помощи цитокалазина-B.

### 9.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

По получении пробы крови необходимо поставить несколько реплик культур.

#### 9.1.1. Выбор культуральной среды

Для культивирования лимфоцитов можно использовать ряд определенных культуральных сред, которые коммерчески доступны и зарекомендовали себя в качестве сред, подходящих для выращивания лимфоцитов в культуре. Для обнаружения наследуемых ломких сайтов в хромосомах не следует использовать среды, не содержащие фолиевой кислоты. Представляется, что определенные питательные среды (F-10 и RPMI-1640) больше способствуют росту чем, например, MEM и TC-199 [113]. Хотя число вторых метафазных (M2) клеток *in vitro* может быть определено методом флюоресценции плюс окрашивание красителем Гимза (ФПГ), хорошим практикой является рутинное использование процедуры культивирования, которая в общем случае дает минимальное число клеток M2 через 48 часов.

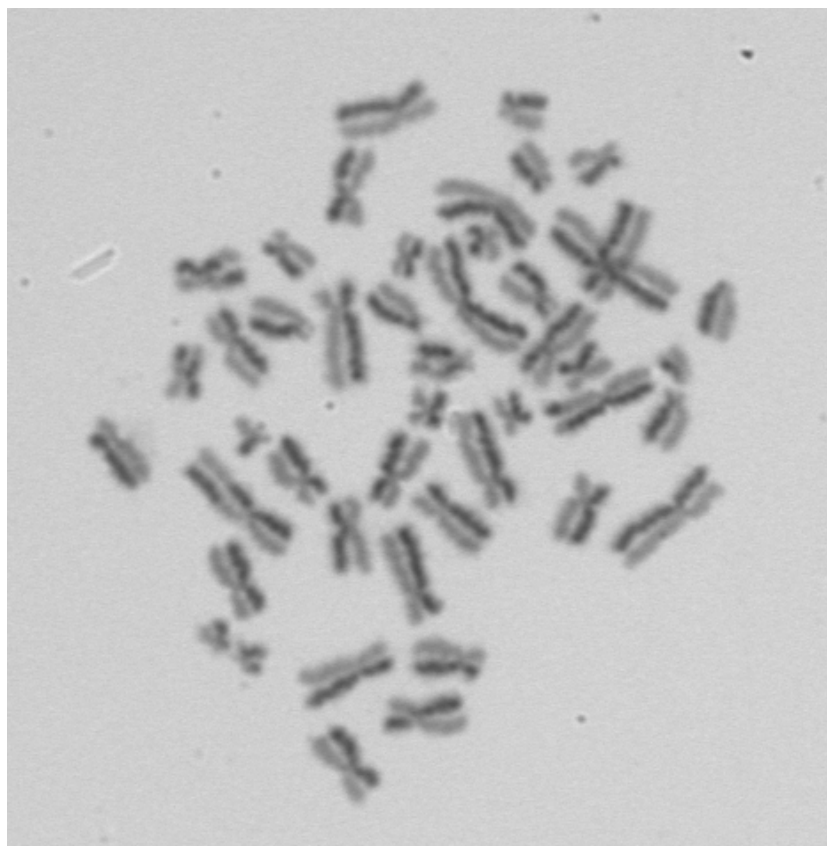
В среду необходимо добавлять L-глутамин, гепарин и антибиотики. Обычно используются пенициллин и стрептомицин (см. подробно в Приложении I). В зависимости от компании-изготовителя, многие среды уже содержат эти антибиотики. Однако если среды приобретены в виде концентрата или порошка, может потребоваться добавка антибиотиков при разведении среды до рабочей концентрации. Некоторые лаборатории предпочитают использовать среды без антибиотиков, но в этом случае особую важность приобретает использование асептических рабочих процедур, включая использование стерильных пробирок для проб крови.

### 9.1.2. Выбор сыворотки

Следует использовать эмбриональную бычью сыворотку или сыворотку человека АВ. Поскольку между партиями сывороток могут иметься значительные различия, поступающие новые партии должны проходить контроль качества с целью проверки их способности поддерживать рост клеток. Сыворотку необходимо термоактивировать при температуре  $56 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 0,5–1 часов в водяной бане, поскольку это помогает снижению различий между партиями. Лимфоциты можно также выращивать в среде, не содержащей сыворотки, и такие среды коммерчески доступны.

### 9.1.3. 5-бромдезоксисуридин

5-бромдезоксисуридин (5-БДУ) вводится в культуры, чтобы обеспечить возможность использования методики «флюоресценция плюс окрашивание красителем Гимза» (ФПГ) [114]. Этот аналог тимидина включается предпочтительно в ДНК во время ее репликации. При различном содержании 5-БДУ в сестринских хроматидах ФПГ-окрашивание создает «эффект арлекина» в метафазной хромосоме клеток, которые находятся на втором делении или более позднем делении после инкорпорации 5-БДУ (Рис. 22).



*РИС. 22. Метафаза второго деления, окрашенная по методу ФПГ, демонстрирует дифференциальное окрашивание сестринских хроматид; «эффект арлекина».*

Универсально установленная концентрация использования 5-БДУ отсутствует. Оптимальное значение варьируется в зависимости от таких факторов, как концентрация тимидина в конкретной используемой культуральной среде. Лаборатория должна провести для себя эксперименты, чтобы определить удовлетворительный уровень содержания 5-БДУ. Общепринято добавлять 5-БДУ в культуральную среду в такой концентрации, чтобы концентрация в окончательной смеси среды не превышала

приблизительно 50 мкМ (15,4 мкг/мл). При превышении этого уровня 5-БДУ может вызвать чрезмерную задержку митоза [115]. Для свежих проб крови (<24 часов) окончательная концентрация 5-БДУ в культуре ок. 15 мкМ часто является удовлетворительной. Если время крови в пути составляет больше 24 часов, концентрацию 5-БДУ, вероятно, придется увеличить до приблизительно 40 мкМ, с тем чтобы достигнуть надежного ФПГ-окрашивания [116]. Следует отметить, что 5-БДУ является светочувствительным соединением, поэтому культуры необходимо готовить при слабом освещении (например, желтый безопасный свет) и далее инкубировать в темноте. Может оказаться целесообразным обернуть емкости для выращивания в алюминиевую фольгу.

При использовании метода с 5-БДУ необходимо выбрать оптимизированное время фиксации, для которого высокий процент анализируемых клеток находится на первом этапе деления. К сожалению, не всегда возможно прогнозировать оптимальное время фиксации. Различия могут быть связаны не только с индивидуальными вариациями, но также с воздействием радиации на время клеточного цикла. У сильно поврежденных клеток может быть значительно замедленная реакция на митогенетическую стимуляцию. На практике лаборатории выполняют выращивание в один заход, обычно 48 часов. Альтернативным вариантом может быть постановка большого количества культур с фиксацией реплик в диапазоне различного времени инкубации, с последующим выбором той, где содержится самая высокая частота клеток в первом митозе. Однако этот вариант является трудоёмким, дорогостоящим и непрактичным, особенно в ситуациях, где может требоваться быстрая оценка большого числа пациентов. Поэтому была предложена небольшая модификация культивирования. Цитохалазин-В (Cyt-B), который обычно используется для препаратов микроядер (Раздел 12), может быть добавлен к культурам на стадии метафазы, и это позволяет различать клетки после различных клеточных делений и выбирать для анализа только клетки первого митоза. Цитохалазин-В добавляется в культуру через 24 часа после начала культивирования с конечной концентрацией 2 мкг/мл. Этот метод сначала использовался Хайата и др. [117], для идентификации клеток в первом клеточном цикле, где дифференцировка была основана на числе хромосом, а не «арлекинском» окрашивании сестринских хроматид соединением 5-БДУ. Метод цитохалазина-В не нашел широкого применения для количественного анализа дицентриков, но его успешно используют при проведении некоторых межлабораторных сравнений оценок доз [118 119].

#### **9.1.4. Митогены**

Некоторые митогены, главным образом растительные лектины, коммерчески доступны. В большинстве случаев конкретные популяции лимфоцитов, которые они стимулируют, точно не определены. Рекомендуются применять фитогемоагглютинин (ФГА), который является наиболее широко используемым митогеном. Несколько изготовителей реализуют два варианта ФГА, иногда называемые типами М и Р. Для обычных культур цельной крови нет необходимости использовать более дорогой и высокочистый материал (Р); однако некоторые лаборатории предпочитают использовать его для выращивания изолированных лимфоцитов.

Имеются и другие доступные митогены, например, конкавалин-А или митоген фитолакки, которые стимулируют определенные субпопуляции лимфоцитов. Их используют в определенных экспериментальных системах и не для клеток человека. Ни один из них не имеет такого широкого действия, как ФГА, и для биологической дозиметрии их использовать не следует.

### 9.1.5. Культуры

Можно использовать автоклавируемые стеклянные или стерильные одноразовые пластиковые контейнеры. Обычно выращивание выполняют в круглодонных одноразовых 10-миллилитровых пробирках. Их следует держать под углом ок. 45°, с неплотно закрытыми крышками, в инкубаторе при температуре 37°C, с 5%-ым содержанием CO<sub>2</sub>. Клетки можно также выращивать без инкубатора с CO<sub>2</sub>, но тогда крышки должны быть плотно закрыты.

Клетки необходимо инкубировать при температуре 37,0±0,5°C. Термостабильность инкубатора является важным показателем, поэтому рекомендуется контролировать его работу, например, при помощи термопары и самописца. Слишком низкая температура приведет к слабому выходу метафаз через 48 часов, если выход вообще будет. При высокой температуре (38°C или выше), клетки будут быстрее проходить через клеточный цикл, и через 48 часов может присутствовать неприемлемо большое число метафаз второго деления [120]. В загруженной работой лаборатории, где совместно используемый инкубатор могут часто открывать и закрывать, есть опасность, что даже при использовании вентилятора температура культур может падать ниже оптимальной в течение существенного времени. Альтернативный вариант – инкубирование в водяной бане с термостатическим контролем. При этом обеспечивается более быстрый перенос тепла к культуре, чем через воздух, и большая тепловая стабильность в течение этих 48 часов. При использовании этого метода свободное пространство над 5 мл культуры должно составлять не менее 10 мл и должно быть заполнено фильтрованным 5%-ым CO<sub>2</sub> в воздухе. Крышки сосудов тогда должны быть плотно закрыты. Водяная баня должна быть снабжена крышкой, чтобы культуры, содержащие 5-БДУ, находились в темноте.

Методы культивирования базируются, с различными модификациями, на методах, первоначально разработанных Мурхедом и др. [121] и Хангерфордом [122]. Вкратце, можно поставить культуры с цельной кровью или с отделенными лимфоцитами. Преимущества и недостатки этих методов связаны с объемами поставляемых образцов крови, временем, необходимым для постановки культуры, и от полученного числа поддающихся подсчету метафаз (более высокий митотический индекс). Критерии определения митотического индекса приведены в Приложении V.

#### 9.1.5.1. Цельная кровь

Этот метод можно использовать для небольших образцов крови (1-2 мл) и, в случае необходимости, для крови, взятой из пальца. Еще одно преимущество – скорость и легкость постановки культур. Однако, число полученных метафаз на одно предметное стекло микроскопа здесь обычно меньше, чем при использовании других методов. Процедура: ввести 0,3 мл цельной крови и 0,1 мл рабочего раствора ФГА в сосуд, содержащий 4 мл среды и 1 мл сыворотки, и инкубировать.

#### 9.1.5.2. Отделенные лимфоциты

При использовании этого метода обогащенный инокулом лимфоцитов вводится в среду. Этот метод подходит для случаев, когда имеется образец крови объемом больше 3 мл. Получить обогащенный инокулом можно двумя способами:

- (а) Первый: Добавить 0,15 мл ФГА к 2 мл крови, и осторожно перемешать эту смесь. Кровь агглютинирует на стенках сосуда. Далее добавить 2 мл сыворотки, осторожно перемешать и центрифугировать в течение одной минуты при 50 g. При помощи шприца удалить ок. 3 мл супернатанта, включая сыворотку, плазму и лейкоцитную пленку, при этом остается большая часть агглютинированных эритроцитов. При

удалении супернатанта конец иглы помогает нарушить лейкоцитную пленку. Для минимизации сдвигового напряжения на клетках использовать иглу с широким отверстием. Для получения двух культур достаточно 3 мл жидкости, и их делят поровну на два сосуда, содержащих 4 мл среды каждый.

- (b) Второй: Лимфоциты можно отделить от цельной крови посредством расслоения на стерильной колонке Ficoll Нураque. Готовые к использованию пробирки для такого разделения лимфоцитов коммерчески доступны. Пробирки центрифугируются и богатый лимфоцитами слой снимается. Он отмывается в физиологическом растворе с фосфатным буфером и помещается в культуру. Концентрацию жизнеспособных клеток можно определить путем исключения красителя в малом объеме аликвоты с подсчетом в гемоцитометре, так чтобы концентрацию клеток в культурах можно было скорректировать к оптимальному значению. Вероятно, это значение будет варьироваться между разными лабораториями, поэтому его следует установить независимо, но предположительно, оно будет находиться в диапазоне  $0,5-2,0 \times 10^6/\text{мл}$ . Детальный протокол для этой цели был разработан Хайата и др. и Макфи и др. [123, 124], и они подчеркивали, что данный метод особенно подходит для получения чистых препаратов с большим количеством метафаз. Некоторые лаборатории считают, что отделенные культуры лимфоцитов лучше использовать для анализа FISH и также при подготовке препаратов для сканирования при помощи систем автоматизированного поиска метафазы (Разделы 10 и 13.3.1). Вероятно, этот метод излишне сложен для подсчета при обычном окрашивании красителем Гимза и использовании обычного оптического микроскопа, где вполне достаточно вышеприведенного метода (a) или культур цельной крови.

#### 9.1.6. Остановка митоза

Для этой цели можно использовать колхицин или его синтетический аналог демеколцин (колцемид), причем большинство исследователей предпочитают именно колцемид в качестве средства остановки митоза. Соответствующий первичный раствор будет содержать 10 мкг/мл колцемид в физиологическом растворе, и если приготовить его стерильным образом и хранить при температуре 4°C, то его срок хранения составит шесть месяцев. Добавление 25–50 мкл этого раствора в каждые 5,0 мл культуры (конечная концентрация: 0,05–0,1 мкг/мл) должно обеспечить достаточное число метафаз, но без возникновения проблем токсичности клеток, которые имеют место при более высоких концентрациях. Колцемид обычно добавляют за 2 или 3 часа до завершения культивирования. Некоторые исследователи [125] предпочитают добавлять колцемид в середине периода культивирования, то есть приблизительно через 24 часа, или, в некоторых случаях, в начале культивирования [123]. Это должно препятствовать выходу клеток за пределы первой метафазы, и тем самым введение колцемид является альтернативным средством предотвращения анализа клеток M2. Следует отметить, что раннее добавление колцемид может вызвать чрезмерное сокращение хромосом, если конечная концентрация в культуре существенно не понижена до ок. 0,05 мкг/мл [123]. Раннее добавление колцемид может позволить культивирование свыше 48 часов, с тем чтобы учесть более длительное время клеточного цикла у некоторых людей, например, пожилых людей.

#### 9.2. ПРОЦЕДУРА ФИКСАЦИИ

Культуры лимфоцитов традиционно инкубируются в течение 48 часов, хотя точное время может варьироваться между разными лабораториями от 46 до 52 часов. Лаборатории должны установить то оптимальное время, при котором стандартная процедура лаборатории дает хороший выход метафаз M1. Также рекомендуется фиксировать лишь часть культуры в стандартное время, оставляя остальное в инкубаторе. Это дает

возможность достичь метафазы клеткам некоторых доноров, для которых на это требуется больше времени, а также дает возможность подсчитать более поздние клетки в тех случаях, когда высокая доза могла вызвать задержку митоза.

После завершения культивирования необходимость соблюдать стерильные процедуры отпадает, и дальнейшую обработку можно выполнять при комнатной температуре, кроме тех случаев, когда задано иначе. Однако важно соблюдать меры безопасности, поскольку образцы крови могут содержать патогены человека. Культуры необходимо центрифугировать, супернатант удалять и заменять гипотоническим раствором (5 мл) хлорида калия 0,075М. Если супернатант удаляется всасыванием, скорость центрифуги должна составить 200 g в течение 10 минут. Однако если супернатант удаляется сливанием, возникает более плотный сгусток клеток (600 g в течение 3 минут), хотя это может привести к повреждению большего числа клеток. Пробирки оставляют стоять в течение ок. 15 минут при температуре 37°C, хотя при использовании изолированных лимфоцитов достаточно 3–5 минут. Возможно также в течение 5-10 минут добавлять ок. 1 мл фиксатора в гипотонический раствор для уменьшения лизиса клеток при центрифугировании. Далее пробирки снова центрифугируют, гипотонический раствор удаляют, а сгусток клеток ресуспендируют в 5-10 мл свежеприготовленного фиксатора (метанол/уксусная кислота в отношении 3:1). Фиксатор следует добавлять медленно, но с постоянной скоростью, при этом в пробирке в то время выполняется перемешивание, например, с помощью вихревой мешалки. Это важное условие, поскольку таким образом гарантируется, что клетки диспергируются в однородную суспензию. Далее клетки снова центрифугируют и ресуспендируют в трех сменах фиксатора. При необходимости, клетки можно длительное время сохранять в фиксаторе, идеально в морозильнике при температуре -20°C. Альтернативно, препараты можно готовить сразу же или на следующий день, а краткосрочное хранение суспензии клетки можно осуществлять при температуре 4°C.

Последнюю смену фиксатора необходимо удалить, оставив его в достаточном количестве (0,25 мл) для получения соответствующего объема суспензии для распределения препарата на предметные стекла. Однако конечный объем зависит от плотности клеток и при необходимости объем можно увеличить за счет растворения с большим количеством фиксирующего раствора. Необходимо использовать чистые и обезжиренные предметные стекла. Хотя некоторые изготовители утверждают, что поставляемые ими предметные стекла достаточно чисты, многие лаборатории предпочитают перестраховаться и хранить предметные стекла в обезжиривающей жидкости. Это может быть смесь ацетона и метанола в отношении 1:1 или смесь эфира и этанола в отношении 1:1, или 1% концентрированная соляная кислота в метаноле. При необходимости, предметные стекла можно сушить и полировать чистой тонкой бумагой. Следует отметить, что качественные бумажные носовые платки не подходят, поскольку в них для мягкости добавлен ланолин. Отделение хромосом улучшается, если предметные стекла являются холодными и влажными. Это может быть достигнуто, если хранить предметные стекла в морозильнике и вынимать их непосредственно перед использованием, плавая иней дыханием в течение нескольких секунд до того, как помещать на них клетки. Альтернативно, предметные стекла можно опускать на несколько секунд в стакан с дистиллированной воды и кубиками льда. Смачивание предметных стекол можно улучшить путем наливании некоторого количества метанола поверх ледяной воды, но без перемешивания. Жидкость с поверхности предметных стекол отряхивают непосредственно перед помещением на них клеток. Опыт показывает, что температура и относительная влажность в лаборатории могут сильно влиять на распределение хромосом. Вариабельность качества, вызываемую этими факторами, можно преодолеть, помещая клетки на предметные стекла в шкаф с регулируемой средой. Шкафы, специально разработанные для цитогенетических лабораторий, коммерчески доступны.



Клетки необходимо хорошо суспендировать в остающемся фиксаторе путем барботирования пипеткой и поместить по две или три капли на предметные стекла. Клетки от одной культуры должны быть распределены по крайней мере на два предметные стекла, а во многих лабораториях предпочитают создать до десяти препаратов из одной культуры. До помещения всех клеток культуры на предметные стекла, хорошо поместить одну каплю суспензии на контрольное предметное стекло. Это позволяет судить о концентрации метафаз, и, при необходимости, остальную суспензию можно сильнее сконцентрировать или разбавить фиксатором. Если внешний вид метафаз на контрольном стекле неудовлетворителен, то есть наблюдаются плохо распределенные кластеры хромосом и чрезмерное количество сгустков клеток, часто ситуации можно помочь, если добавить еще одну смену фиксатора, закрыть пробирки пробкой и поставить на ночь в холодильник, а на следующий день выполнить центрифугирование и размещение клеток. Дать предметным стеклам высохнуть на воздухе – и это можно ускорить, если слегка нагреть их над горячей плиткой, поместить их в легкий поток подогретого или комнатного воздуха от вентилятора, или помахать ими через спиртовку (не допускать зажигания фиксатора).

### 9.3. ОКРАШИВАНИЕ

Рекомендуется использовать метод флюоресценция плюс окрашивание по Гимза (ФПГ), поскольку это позволяет ограничить анализ метафазами первого деления (M1) *in vitro* [126]. Однако у этого метода есть определенные недостатки, которые можно преодолеть путем использования как традиционного окрашивания красителем Гимза, так и ФПГ. Во многих лабораториях отмечают значительную вариабельность в качестве ФПГ-окрашивания между стеклами-репликами, и также между различными участками на одном и том же стекле. Метод ФПГ наиболее эффективен, если препараты после приготовления выдержать несколько дней (до пяти). Остальные препараты можно положить в коробку и до использования хранить при температуре -20°C. При использовании более свежих препаратов или препаратов, хранившихся больше двух-трех недель, качество оказывается хуже. Хранение ФПГ-окрашенных препаратов больше нескольких недель до подсчета может привести к ухудшению их состояния. Отсюда возникает риск, что изображения ФПГ-окрашенных метафаз могут быть недостаточно четки для точного различения всех аберраций. Однако качество обычно достаточно для определения соотношения между клетками M1, которые не являются дифференцированно окрашенными, и клетками M2, которые окрашены с «эффектом арлекина». Для контроля успешности окрашивания в партию препаратов следует также включать несколько препаратов, приготовленных из культур более длительной выдержки (72 часа), о которых известно, что они содержат клетки M2.

Таким образом, рекомендуемый протокол предлагает выполнять ФПГ-окрашивание одного препарата или нескольких препаратов-реplik от каждой культуры. При хорошем окрашивании препараты можно использовать для подсчета аберраций в клетках M1. В противном случае эти препараты следует использовать для проверки отношения M1/M2, а анализ аберраций выполнять на препаратах-репликах той же самой культуры, которые были окрашены красителем Гимза при условии, что уровень клеток M2 составляет меньше 5% по оценке ФПГ. При более высоком уровне может потребоваться корректировка выхода аберраций, что может внести некоторую дополнительную погрешность. Для этого могут потребоваться определенные допущения, например, относительно доли дицентриков в клетках M2, которые все еще сопровождаются ацентрическим фрагментом. Как подчеркивалось выше, предпочтительно принять такой метод культивирования, который дает небольшое количество клеток M2, хотя, конечно, это нельзя прогнозировать для любого человека, поскольку разные люди по-разному реагируют на стимуляцию лимфоцитов и имеют различную способность к пролиферации лимфоцитов [127].

Адаптация к альтернативным методам культивирования, таким как культивирование с Cyt-B с коллемеидом или с ранним коллемеидом может обеспечить более легкую и более быструю альтернативу методу ФПГ- окрашивания [117–119, 125]. Применение этих методов может быть особенно целесообразно в сценариях сортировки, где требуется оперативная оценка дозы.

### **9.3.1. Предварительная обработка**

Предварительная обработка предметных стекол РНКазой А до окрашивания может удалить остаток окрашиваемого цитоплазматического материала [128]. Это факультативная процедура, благодаря которой можно получать намного более четкое изображение хромосом для подсчета в препарате, окрашенном блоком, с «арлекиновой» окраской или с дифференциальным окрашиванием. Кроме того, эта обработка оказалось целесообразной для препаратов, оцениваемых при помощи автоматических систем анализа изображения.

Протокол: Первичный раствор РНКазы 10 мг/мл в буфере Tris ЭДТК нагревать в течение 10 минут при температуре 70°C, затем дать медленно охладиться. Аликвоты можно хранить в течение нескольких лет при температуре -20°C. Предметные стекла ополоснуть в дистиллированной воде и поместить в раствор РНКазы 0,5 мг/мл (первичный раствор : дистиллированная вода в отношении 1: 20) на 10 минут при температуре 37°C. Это может быть сделано или в предварительно нагретом сосуде для окрашивания или, что более экономно, меньший объем разбавленного первичного раствора можно поместить на предметное стекло под покровное стекло. Далее предметные стекла моются в дистиллированной воде, помещаются на 2 минуты в фиксатор метанол:уксусная кислота в отношении 3:1, сушатся и окрашиваются, как описано ниже. Процедур очистки РНКазой можно также использовать после удаления красителя со старых стекол или для препаратов микроядер. Для этих применений значения концентрации и времени могут быть другими [128].

### **9.3.2. Флюоресценция плюс окрашивание красителем Гимза (ФПГ)**

Этот метод взят из публикации Перри и Вольфа [114] с некоторыми модификациями. Приблизительно десять капель красителя Хехста 33258 (0,5 мкг/мл в фосфатном буфере pH=6,8) поместить на предметное стекло под покровное стекло, обеспечивая отсутствие попадания воздушных пузырьков. На данном этапе сотрудники лаборатории, работающие с флюоресцентным микроскопом, могут при желании сделать быструю проверку отношения M1/M2 при помощи метода Лэтта [129], который дает очень быстро исчезающий «эффект арлекина». Или же предметные стекла можно поставить под ультрафиолетовую лампу мощностью 20 Вт (> 310 нм) на 0,5 часа или, альтернативно, под флуоресцентную ленточную лампу мощностью 30 Вт приблизительно на 1,5 часа. После осторожного снятия покровных стекол предметные стекла необходимо хорошо промыть в фосфатном буфере pH=6,8. На этом этапе в некоторых лабораториях предметные стекла помещают в 2 x SSC (хлорид натрия 0,3М и тринатрий цитрат 0,03М) с температурой 60°C приблизительно на 20-30 минут.

Опыт показал, что этот этап SSC можно опустить, если он приводит к нежелательному распуханию хроматид, затрудняющему анализ под микроскопом. Однако при использовании 2 x SSC удаляются некоторые сгустки клеток, что дает более чистые препараты. Далее предметные стекла отмывают в дистиллированной воде, после чего погружают в краситель Гимза (5-10% в буфере pH=6,8, Gurr R66) на 3-5 минут. Далее их ополаскивают в буфере, затем в дистиллированной воде, и дают высохнуть. На данном этапе препараты можно исследовать под микроскопом или очищать и ставить под предметное стекло.

### 9.3.3. Традиционное окрашивание красителем Гимза

Предметные стекла погружают в 2%-ый (улучшенный Gurr R66) краситель Гимза в фосфатном буфере с  $\text{pH}=6,8$  на 5 минут, отмывают в буфере, быстро ополаскивают в дистиллированной воде, дают высохнуть, и в конце устанавливают покровное стекло с использованием заливочной среды. На Рис. 10 и 11 показаны метафазы, окрашенные красителем Гимза.

Окрашивание можно определенным образом модифицировать специально для выделения центромер, хотя для опытных счетчиков это обычно не требуется [130]. Такого выделения можно добиться при помощи метода FISH с панцентромерным зондом (Рис. 27) или при окрашивании красителем Гимза с использованием метода С-дифференциального окрашивания (Рис. 23).



*РИС. 23. Метафаза, окрашенная красителем Гимза методом С-дифференциального окрашивания для выделения центромер*

Протокол С-дифференциального окрашивания:

- 1) Поместить предметные стекла в соляную кислоту 0,2 N на 30 минут при комнатной температуре.
- 2) Три раза выполнить отмывку в дистиллированной воде.
- 3) Поместить предметные стекла в 5%-ую гидроокись бария на 1 минуту при температуре 60°C.
- 4) Выполнить отмывку в 0,2 N HCl в течение 2 минут.
- 5) Выполнить отмывку в дистиллированной воде в течение 2 минут.
- 6) Поместить в 2 x SSC на 45 минут при температуре 60°C.
- 7) Выполнить отмывку в дистиллированной воде.

- 8) Дать высохнуть на воздухе и выполнить окрашивание 2%-ым красителем Гимза в фосфатном буфере с  $pH=6,8$  в течение 10 минут.
- 9) Если интенсивность окрашивания оказывается недостаточной, препараты можно повторно погрузить в краситель Гимза еще на 5-10 минут.

#### 9.4. АНАЛИЗ ПРЕПАРАТОВ НА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКЛАХ

##### 9.4.1. Обычная микроскопия

Предметные стекла должны быть кодированы для предотвращения необъективности при подсчете, и они должны просматриваться методично, с тем чтобы охватить всю область. Просмотр должен выполняться с малым увеличением (приблизительно от  $\times 100$  до  $\times 200$ ). На этом уровне невозможно просчитать, ли все хромосомы присутствуют, и невозможно обнаружить аберрации. Однако по мере практики счетчик приобретает навык идентификации тех препаратов, где находится около 40 единиц или больше, и тех изображений, которые при большем увеличении, вероятно, будут поддаваться анализу. Важно, чтобы этот начальный просмотр был сделан с достаточно малым увеличением, чтобы не допустить предпочтения выбора клеток, содержащих аберрации. Найдя вероятную метафазу, счетчик должен переключиться на большое увеличение (ок.  $\times 1000$  до  $\times 2000$ ), игнорируя, по возможности, присутствие любых аберраций, и сделать оперативный вывод о том, позволяет ли качество хромосом выполнить подсчет. Этот вывод будет основан на резкости и количестве скручиваний и наложений хромосом. Если при работе с ФПГ-окрашенным материалом клетка демонстрирует «эффект арлекина», ее следует отклонить, поскольку этот эффект указывает на отсутствие M1.

Если принято решение анализировать препарат, то подсчитывается число отдельных хромосом и отмечается присутствие аберраций. Рекомендуются регистрировать лишь полные метафазы, то есть те, которые содержат 46 центромер. Если клетка содержит нестабильные аберрации, то она должна балансироваться. Например, препарат, содержащий дицентрик, должен также иметь ацентрический фрагмент, но все равно содержать 46 объектов. В отличие от этого, центрическое кольцо также будет иметь сопровождающий фрагмент, но общее количество объектов в клетке составит 47. Каждый избыточный ацентрик, то есть ацентрик, не связанный с дицентриком или центрическим кольцом, увеличивает количество объектов свыше 46. При регистрации аберраций, фрагменты, связанные с дицентриком или кольцом, не должны включаться в счет избыточных ацентриков. Когда речь идет о высоких дозах излучения, в препарате может наблюдаться более одной аберрации, но объекты все равно должны быть сбалансированы. Аберрации трицентрики эквивалентны двум дицентрикам и должны иметь два сопровождающих фрагмента, в то время как у quadriцентриков будет три фрагмента, и так далее. Все аномалии клетки должны быть зарегистрированы, хотя для дозиметрии обычно используются лишь данные по дицентрикам или дицентрикам плюс кольца. Координаты X и Y столика микроскопа для всех полных проанализированных клеток, включая те, которые не содержат аберрации, должны быть зарегистрированы для возможной будущей справки.

##### 9.4.2. Автоматизированная микроскопия

Во многих лабораториях был внедрен поиск метафазы при помощи автоматизированных систем распознавания образов, и ряд таких систем выпускаются серийно. Эти приборы также включают полуавтоматический анализ оцифрованных изображений, что помогает определить местонахождение aberrантных хромосом. Однако ни одна система не является полностью автоматической; все они включают этапы, где требуется суждение и решение оператора. Использовать эти приборы следует таким образом, чтобы соблюдались вышеописанные рекомендуемые критерии, а именно, выбор

кандидатных метафаз для подсчета не должен вносить смещение, которое может исказить выход аберраций, и подсчитывать следует лишь полные препараты хромосом. Автоматизированные системы поиска клеток и подсчета подробно рассматривается в Разделе 13.

## 9.5. РЕГИСТРАЦИЯ ДАННЫХ

Хорошая лабораторная практика требует, чтобы для образцов, предметных стекол и соответствующих документов была разработана система уникальных идентифицирующих кодов или маркировки. Получение и обработка образцов, как для экспериментов, так и для исследований повышенной дозы, должны быть зарегистрированы в лабораторном журнале. Электронные системы хранения и обработки данных имеются на рынке (см. Раздел 13.4). Однако многие исследователи все еще делают записи своих наблюдений, полученных с помощью микроскопа, на листе подсчета, и большинство лабораторий разработали свои собственные предпочтительные способы регистрации данных. В электронных системах имеется много способов хранения и отображения данных, способных удовлетворить лаборатории. Важно обеспечить возможность извлечения первичных данных, включающих наблюдения по каждой клетке, с тем чтобы в будущем можно было сделать все возможные компиляции и обобщения данных.

Таблица 6 иллюстрирует простую структуру таблицы данных для регистрации аберраций.

ТАБЛИЦА 6. СТРУКТУРА ТАБЛИЦЫ ДАННЫХ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ АБЕРРАЦИЙ

Проба №:

Полсчет выполнил:

Микроскоп №:

Дата:

| № клетки | Координаты<br>столика<br>микроскопа |     | К-во<br>хромосомных<br>объектов | Дицентрики | Центрические<br>кольца | Избыточные<br>ацентрики | Примечания           |
|----------|-------------------------------------|-----|---------------------------------|------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
|          | x                                   | y   |                                 |            |                        |                         |                      |
| 1        | 100,1                               | 1,2 | 46                              |            |                        |                         |                      |
| 2        | 103,4                               | 1,5 | 47                              | 1          |                        | 1                       |                      |
| 3        | 105,4                               | 1,2 | 49                              | 2          | 1                      | 2                       |                      |
| 4        | 112,4                               | 1,6 | 46                              |            |                        |                         |                      |
| 5        | 112,7                               | 1,8 | 48                              |            |                        | 2                       |                      |
| 6        | 120,1                               | 1,2 | 46                              | 1          |                        |                         |                      |
| 7        | 122,7                               | 1,5 | 47                              |            | 1                      |                         |                      |
| 8        | 124,1                               | 1,4 | 45                              |            |                        |                         | Хроматидный<br>обмен |
| 9        | 126,8                               | 1,7 | 46                              | 2*         |                        |                         | *= 1<br>трицентрик   |
| и т.д.   |                                     |     |                                 |            |                        |                         |                      |

Информация в этой таблице позволяет идентифицировать любую клетку для повторной проверки в будущем, если таковая потребуется. Используя метод традиционного окрашивания красителем Гимза, получают данные по нестабильным абберациям, которые являются чрезвычайно важными для биологической дозиметрии, хотя не предпринималось никаких попыток для отдельного перечисления точечных фрагментов, фрагментов и ацентрических колец. Это объясняется тем, что их не всегда возможно отличить друг от друга. Однако по желанию их можно регистрировать как М (minutes), F (fragments) и AR (acentric rings), соответственно, вместо цифр в столбце «Избыточные ацентрики». Столбец «Примечания» можно использовать для регистрации других аномалий, например, числовых аббераций, стабильных повреждений хромосом или аббераций хроматид. Из таблицы можно легко извлечь любую другую числовую информацию, которая может потребоваться, например, процент клеток, имеющих повреждения, или распределение аббераций между клетками.

## 9.6. ХРАНЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ И ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Совершенно очевидно, что данные исследований должны быть зарегистрированы и сохранены для обращения в будущем. Стоит подчеркнуть, что файлы, относящиеся к случаям превышения дозы, могут потребовать повторного исследования в отдаленном будущем. Если у человека разовьется злокачественная опухоль, возможно, несколько десятилетий спустя, случай может быть вновь открыт для решения вопросов компенсации.

Большинство лабораторий хотят или обязаны хранить также предметные стекла микроскопа, и это может создавать некоторые проблемы. Препараты с традиционным окрашиванием красителем Гимза выцветают, а ФПГ-окрашенный материал создает еще больше трудностей, поскольку часто выцветает через несколько месяцев. Рекомендуется хранить окрашенные препараты в коробке в сухом месте при комнатной температуре. Однако, выцветшие препараты можно восстановить, если осторожно отмочить покровное стекло и повторно выполнить традиционное окрашивание красителем Гимза. Попытки выполнить повторное ФПГ-окрашивание не удаются. Для сохраненных препаратов-реплик, выдерживаемых при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , которые никогда не были окрашены, можно также выполнить традиционное окрашивание красителем Гимза через много лет.

Целесообразно также сохранять избыточные фиксированные клетки, оставшиеся от исследований превышения дозы. Для простоты хранения их можно сконцентрировать в небольшие ампулы (2 мл) и хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Препараты, полученные из этого материала, можно окрасить традиционно, по методу ФПГ или FISH несколько лет спустя, если потребуется.

## 9.7. ОЦЕНКА ДОЗЫ

### 9.7.1. Выбор кривой

Излучениями, которым обычно подвергается персонал, являются гамма и рентгеновское излучение, и иногда деградировавшие нейтроны. Обычно обнаруживается различие между кривыми выхода рентгеновского и гамма излучения, особенно при низких дозах ( $<0,5$  Гр). Поэтому рекомендуется иметь калибровочную кривую для соответствующей энергии рентгеновского излучения (например, 200-250 кВп), а также или для  $^{60}\text{Co}$ , или для  $^{137}\text{Cs}$ . Как правило, большинство научно-исследовательских лабораторий имеют более легкий доступ к источнику  $^{60}\text{Co}$ , а не  $^{137}\text{Cs}$ . Для нейтронов деградированный энергетический спектр аналогичен спектру деления. Имеющиеся данные указывают, что кривые доза-эффект для нейтронов спектра деления являются линейными и мало изменяются в зависимости от энергии нейтронов. Таким образом, достаточно одной калибровочной кривой, полученной для спектра деления.

В промышленной радиографии широко используется изотоп  $^{192}\text{Ir}$ , и энергия его гамма-излучения составляет в среднем 400 кэВ. Лишь у немногих лабораторий есть доступ к этому изотопу для получения калибровочной кривой, которая должна находиться где-то между кривыми рентгеновского и гамма-излучения  $^{60}\text{Co}/^{137}\text{Cs}$ . Однако обычно считают, что она лежит ближе к последней, и таким образом рекомендуется использовать кривую гамма-излучения.

### 9.7.2. Число клеток для анализа

Для получения оценки дозы со статистической неопределенностью, достаточно малой для того, чтобы оценка быть значимой, необходимо, как правило, подсчитать большое число клеток. Решение о том, сколько клеток проанализировать, является компромиссом между такими факторами, как важность случая, наличие персонала и качество препаратов. Например, после облучения дозой в несколько грей и выше, количество лимфоцитов у человека может сильно уменьшиться, и это будет отражено в низком числе метафаз на предметных стеклах. Однако, поскольку число аберраций на одну клетку высоко, приемлемую оценку можно получить на основе анализа лишь нескольких десятков клеток. Важно учитывать неопределенность дозы в зависимости от числа подсчитанных клеток при развертывании анализа дицентриков как средства сортировки для быстрой оценки после события с большим количеством пострадавших. Эта тема более полно рассматривается ниже (Раздел 14).

Для более низких доз, когда число доступных клеток не является ограничивающим фактором, оценку дозы можно обосновать приблизительно на 500 клетках. Для этого может потребоваться 2–3 человеко-дня работы с обычным микроскопом, хотя в чрезвычайной ситуации несколько человек могут работать совместно на подсчете предметных стекол. Для низкого или нулевого выхода дицентриков доверительные интервалы, полученные на 500 подсчитанных клеток, обычно являются достаточными. Решение расширить подсчет от 500 до 1000 или больше клеток принимается в том случае, если имеются доказательства серьезного переоблучения, оправдывающего расширенный анализ, или если под угрозой находится дальнейшая занятость работника, занятого на радиационно-опасном производстве. Совершенно очевидно, что не существует какого-либо единственного определенного числа клеток, которое можно рекомендовать для применения во всех случаях. Однако в качестве общего правила для определения разумно точной оценки дозы предлагается подсчитывать 500 клеток или 100 дицентриков.

В Таблице 7 показаны доверительные интервалы, рассчитанные при использовании данного метода, для нескольких оценок дозы вплоть до 1,0 Гр.

ТАБЛИЦА 7. ЭФФЕКТ УВЕЛИЧЕНИЯ ЧИСЛА КЛЕТОК, ИССЛЕДОВАННЫХ НА НИЖНИХ И ВЕРХНИХ ГРАНИЦАХ 95%-ОГО ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА ДЛЯ ЧЕТЫРЕХ ОЦЕНОК ОСТРОЙ ДОЗЫ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ  
(основано на кривой Рис. 24)

| Оценка дозы,<br>мГр | Доверительный<br>интервал | К-во исследованных клеток |      |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|------|
|                     |                           | 500                       | 1000 |
| 100                 | Верх. граница             | 320                       | 245  |
|                     | Нижн. граница             | <0                        | 16   |
| 250                 | Верх. граница             | 448                       | 380  |
|                     | Нижн. граница             | 111                       | 141  |
| 500                 | Верх. граница             | 677                       | 627  |
|                     | Нижн. граница             | 333                       | 383  |
| 1000                | Верх. граница             | 1178                      | 1127 |
|                     | Нижн. граница             | 830                       | 881  |

Простой метод вычисления доверительного интервала для оценки дозы рассматривается в следующем разделе 9.7.3.

### 9.7.3. Неопределенность оценок дозы

В то время как выведение дозы из измеренного выхода дицентриков не представляет никакой трудности, есть много различных путей выведения неопределенности выхода. Цель состоит в том, чтобы выразить неопределенность через доверительный интервал, который принято вычислять как 95%. 95%-ый доверительный интервал определяет тот интервал, который охватывает истинную дозу для как минимум 95% случаев. Трудность в вычислении доверительного интервала возникает потому, что неопределенность имеет две составляющих: одна из них – это пуассоновский характер выхода аберраций, видимых в пробе крови переоблученного человека, а другая составляющая связана с неопределенностью, относящейся к калибровочной кривой, которая имеет приблизительно нормальное распределение. Эта проблема рассматривалась в литературе Саваджем и др. [131], Мерклем [105] и позже, Шлюинска и др. [132]. Меркль предложил самое простое решение, которое учитывает как пуассоновскую погрешность по выходу дицентриков, так и погрешности калибровочной кривой.

Подход Меркля, иллюстрированный на Рис. 24, включает следующие этапы:

- 1) Принимая распределение Пуассона, вычислить выходы, соответствующие нижней и верхней границе 95%-ого доверительного интервала для наблюдаемого выхода ( $Y_L$  and  $Y_U$ ).
- 2) Вычислить дозу, при которой  $Y_L$  пересекает верхнюю кривую. Это нижняя граница доверительного интервала ( $D_L$ ).
- 3) Вычислить дозу, при которой  $Y_U$  пересекает нижнюю кривую. Это верхняя граница доверительного интервала ( $D_U$ ).

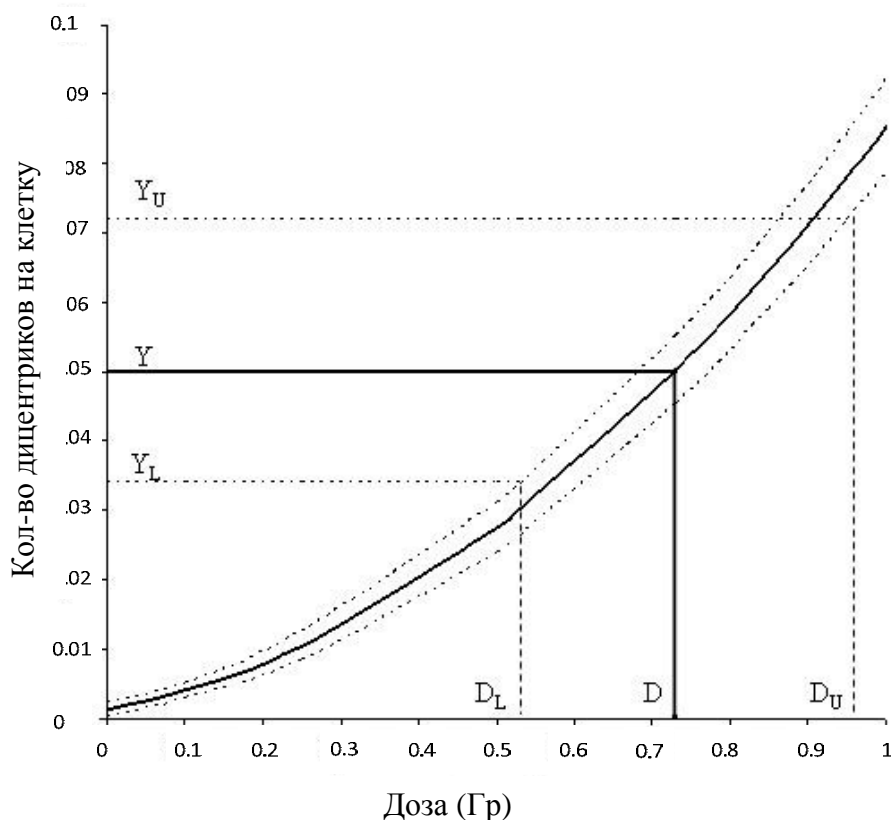


РИС. 24. Калибровочная кривая доза-эффект с 95%-ым доверительным интервалом, используемая для оценки неопределенностей



*Пример:* Были проанализированы пятьсот клеток, и в 25 из них наблюдалось по одному дицентрику в каждой. Это дает выход (Y) 0,05 дицентриков на клетку, а параметр разброса и u-критерий составляют 0,95 и -0,78 соответственно. Доза была оценена при помощи кривой доза-эффект для  $^{60}\text{Co}$ , показанной на Рис. 24, для которой ниже приведены значения коэффициентов, дисперсии и ковариации.

$C = 1,28\text{E-}3$   
 $\alpha = 2,10\text{E-}2$   
 $\beta = 6,31\text{E-}2$   
 $\text{var } C = 2,22\text{E-}07$   
 $\text{var } \alpha = 2,66\text{E-}05$   
 $\text{var } \beta = 1,61\text{E-}05$   
 $\text{covar } (C, \alpha) = -9,95\text{E-}07$   
 $\text{covar } (C, \beta) = 4,38\text{E-}07$   
 $\text{covar } (\alpha, \beta) = -1,512\text{E-}05$

- 1) Поскольку кривая доза-эффект является линейно-квадратичной ( $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ ), оценку дозу, составляющей 0,73 Гр, получаем, решая уравнение:

$$D = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta(Y - C)}}{2\beta} \quad (6)$$

- 2)  $Y_L$  и  $Y_U$  получены из стандартных статистических таблиц доверительных интервалов для математического ожидания переменной Пуассона [133]. В Таблице 8 показаны 95%-ые интервалы для значений наблюдаемых дицентриков от 0 до 103. Для 25 дицентриков, наблюдаемых в этом примере,  $Y_L$  равно  $16,768/500 = 0,034$ , а  $Y_U$  равно  $36,03/500 = 0,072$ .

ТАБЛИЦА 8. ПУАССОНОВСКАЯ ВЕРХНЯЯ И НИЖНЯЯ ГРАНИЦЫ 95%-ОГО ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА ДЛЯ НАБЛЮДАЕМОГО ЧИСЛА ДИЦЕНТРИКОВ (X) (адаптация из [133])

| X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X  | Нижняя граница | Верхняя граница |
|----|----------------|-----------------|----|----------------|-----------------|----|----------------|-----------------|----|----------------|-----------------|
| 0  | 0              | 3,285           | 26 | 16,77          | 37,67           | 52 | 38,165         | 66,76           | 78 | 61,9           | 96,06           |
| 1  | 0,051          | 5,323           | 27 | 17,63          | 38,165          | 53 | 39,76          | 68,1            | 79 | 62,81          | 97,545          |
| 2  | 0,355          | 6,686           | 28 | 19,05          | 39,76           | 54 | 4,094          | 69,62           | 80 | 62,81          | 99,17           |
| 3  | 0,818          | 8,102           | 29 | 19,05          | 40,94           | 55 | 40,94          | 71,09           | 81 | 63,49          | 99,17           |
| 4  | 1,366          | 9,598           | 30 | 20,335         | 41,75           | 56 | 41,75          | 71,28           | 82 | 64,95          | 100,32          |
| 5  | 1,97           | 11,177          | 31 | 21,36          | 43,45           | 57 | 43,45          | 72,66           | 83 | 66,76          | 101,71          |
| 6  | 2,613          | 12,817          | 32 | 21,36          | 44,26           | 58 | 44,26          | 74,22           | 84 | 66,76          | 103,315         |
| 7  | 3,285          | 13,765          | 33 | 22,945         | 45,28           | 59 | 44,26          | 75,49           | 85 | 66,76          | 104,4           |
| 8  | 3,285          | 14,921          | 34 | 23,76          | 47,025          | 60 | 45,28          | 75,785          | 86 | 68,1           | 104,58          |
| 9  | 4,46           | 16,768          | 35 | 23,76          | 47,69           | 61 | 47,025         | 77,16           | 87 | 69,62          | 105,905         |
| 10 | 5,323          | 17,633          | 36 | 25,4           | 48,74           | 62 | 47,69          | 78,73           | 88 | 71,02          | 107,32          |
| 11 | 5,323          | 19,05           | 37 | 26,31          | 50,42           | 63 | 47,69          | 79,98           | 89 | 71,09          | 109,11          |
| 12 | 6,686          | 20,335          | 38 | 26,31          | 51,29           | 64 | 48,74          | 80,25           | 90 | 71,28          | 109,61          |
| 13 | 6,686          | 21,364          | 39 | 27,735         | 52,15           | 65 | 50,42          | 81,61           | 91 | 72,66          | 110,11          |
| 14 | 8,102          | 22,945          | 40 | 28,97          | 53,72           | 66 | 51,29          | 83,14           | 92 | 74,22          | 111,44          |
| 15 | 8,102          | 23,762          | 41 | 28,97          | 54,99           | 67 | 51,29          | 84,57           | 93 | 75,49          | 112,87          |
| 16 | 9,598          | 25,4            | 42 | 30,02          | 55,51           | 68 | 52,15          | 84,67           | 94 | 75,49          | 114,84          |
| 17 | 9,598          | 26,306          | 43 | 31,675         | 56,99           | 69 | 53,72          | 86,01           | 95 | 75,785         | 114,84          |

| X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X  | Нижняя граница | Верхняя граница | X   | Нижняя граница | Верхняя граница |
|----|----------------|-----------------|----|----------------|-----------------|----|----------------|-----------------|-----|----------------|-----------------|
| 18 | 11,177         | 27,735          | 44 | 31,675         | 58,72           | 70 | 54,99          | 87,48           | 96  | 77,16          | 115,605         |
| 19 | 11,177         | 28,966          | 45 | 32,28          | 58,84           | 71 | 54,99          | 89,23           | 97  | 78,73          | 116,93          |
| 20 | 12,817         | 30,017          | 46 | 34,05          | 60,24           | 72 | 55,51          | 89,23           | 98  | 79,98          | 118,35          |
| 21 | 12,817         | 31,675          | 47 | 34,665         | 61,9            | 73 | 56,99          | 90,37           | 99  | 79,98          | 120,36          |
| 22 | 13,765         | 32,277          | 48 | 34,665         | 62,81           | 74 | 58,72          | 91,78           | 100 | 80,25          | 120,36          |
| 23 | 14,921         | 34,048          | 49 | 36,03          | 63,49           | 75 | 58,72          | 93,48           | 101 | 81,61          | 121,06          |
| 24 | 14,921         | 34,665          | 50 | 37,67          | 64,95           | 76 | 58,84          | 94,23           | 102 | 83,14          | 122,57          |
| 25 | 16,768         | 36,03           | 51 | 37,67          | 66,76           | 77 | 60,24          | 94,705          | 103 | 84,57          | 123,77          |

- 3) Нижняя и верхняя граница 95%-ого доверительного интервала кривой могут быть вычислены при помощи уравнения:

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4 + 2\text{covar}(C, \alpha)D + 2\text{covar}(C, \beta)D^2 + 2\text{covar}(\alpha, \beta)D^3} \quad (7)$$

где:

$R^2$  – доверительный уровень регрессии, составляющий 95%-ый доверительный интервал распределения хи-квадрат  $\chi^2$  (df, 95%), с 2 или 3 степенями свободы (df).

Для линейно-квадратичной кривой (df = 3)  $R^2$  составляет 7,81, а для линейной кривой 5,99. В Ур. (7) следует использовать значение 2,79, а в случае линейной кривой следует использовать значение 2,45. Поскольку как для наблюдаемого выхода дицентриков, так и для калибровочной кривой, берется 95%-ый доверительный интервал, некоторые авторы предложили использовать 83%-ый доверительный интервал кривой регрессии вместо 95%, чтобы уменьшить возможную переоценку неопределенности [134, 135]. В этом случае  $R^2$  будет составлять 5,02 для линейно-квадратичной кривой и 3,54 для линейной кривой.

- 4) Точка, где  $Y_L$  пересекает верхнюю доверительную границу, которая является нижней границей 95%-ого доверительного интервала оцененной дозы ( $D_L$ ), может быть вычислена путем итераций. Можно использовать функцию «Решатель» (Solver) программы Excel. Таким же образом можно определить точку, где  $Y_U$  пересекает нижнюю доверительную границу ( $D_U$ ). Для взятого примера  $D_L$  и  $D_U$  составляют 0,51 и 0,97 Гр, соответственно.

В случае недоступности ковариаций доверительный интервал можно аппроксимировать путем Ур. (8). Это уравнение справедливо, поскольку вклад ковариаций в неопределенность сравнительно мал.

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4} \quad (8)$$

Для известных калибровочных кривых, основанных на большом количестве подсчетов, дисперсия, определяемая кривой, мала по сравнению с дисперсией, определяемой выходом дицентриков, и ей можно пренебречь. Более простую приблизительную оценку  $D_L$  и  $D_U$  можно получить непосредственно из калибровочной кривой, в точке, где  $Y_L$  и  $Y_U$  пересекают сплошную линию на Рис. 25.

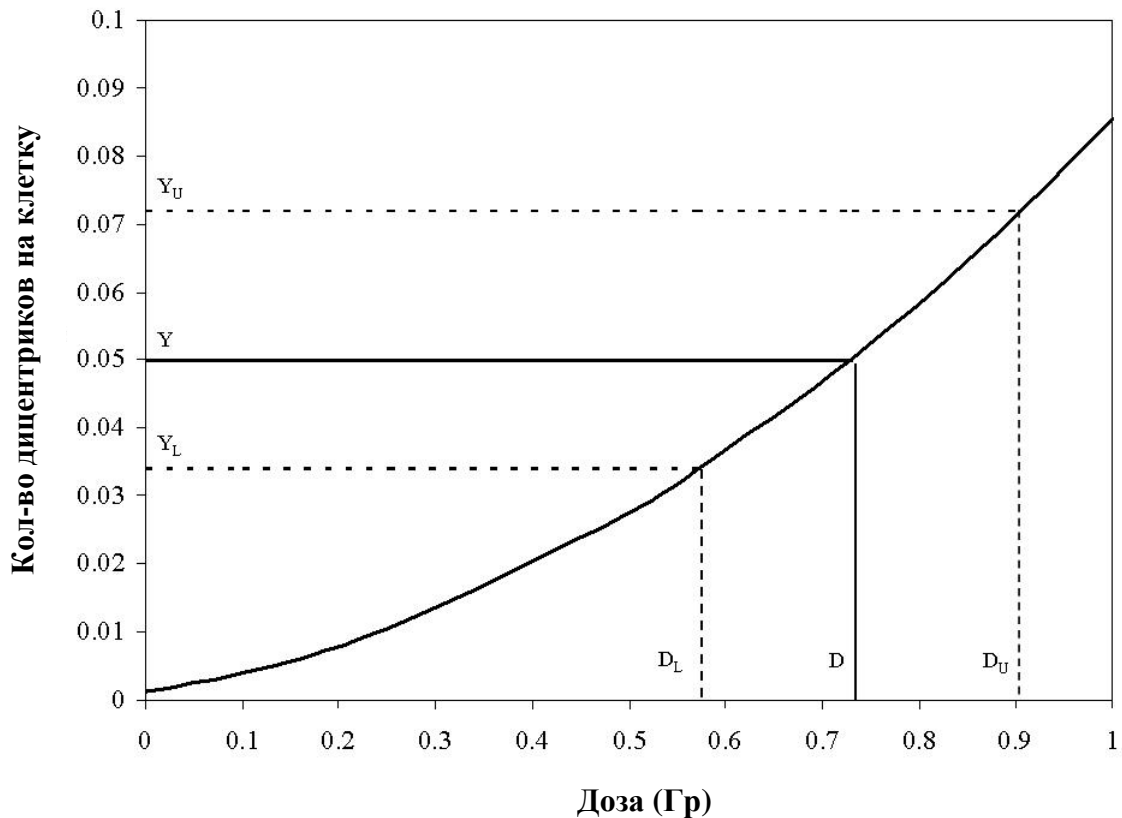


РИС. 25. Калибровочная кривая доза-эффект, используемая для оценки неопределенностей (пренебрегая погрешностью, связанной с кривой).

В рассматриваемом примере 0,73 Гр погрешность, связанная с кривой, составляет 0,002; это значение получено подстановкой значения 0,73 Гр для D в последнем члене Ур. (7). Полученное значение меньше, чем SE, связанное с наблюдаемым выходом дицентриков  $(25)^{1/2}/500$ , который равен 0,01. При таком подходе  $D_L$  и  $D_U$  равны 0,57 и 0,91.

Если статистика u-критерия превышает 1,96,  $Y_U$  и  $Y_L$  необходимо откорректировать, чтобы учесть чрезмерный разброс, путем умножения на приведенный ниже коэффициент, где CL – доверительный интервал Пуассона, приводимый в стандартных таблицах, X – число наблюдаемых дицентриков, а  $\sigma^2/y$  – наблюдаемый параметр разброса:

$$Factor = \left( \frac{CL}{X} \right)^{\sqrt{\sigma^2/y}} \quad (9)$$

Если в вышеприведенном примере вместо 25 клеток с одним дицентриком наблюдалось 19 клеток с одним дицентриком и 3 клетки с двумя дицентриками, тогда  $\sigma^2/y$  будет составлять 1,19, а значение u = 3,19. В этом случае  $Y_U$  и  $Y_L$ :

$$Y_U = \frac{36.03}{500} \times \left( \frac{36.03}{25} \right)^{\sqrt{1.19}} = 0.1074 \quad (10)$$

$$Y_L = \frac{16.77}{500} \times \left( \frac{16.77}{25} \right)^{\sqrt{1.19}} = 0.0217 \quad (11)$$

При использовании этих значений,  $D_L$  и  $D_U$  будут составлять 0,39 и 1,19 Гр, соответственно.

#### 9.7.4. Расширение вычислений дозы для более сложных сценариев облучения

Предыдущий раздел относится к случаям, когда большое острое аварийное переоблучение излучением с относительно низкой ЛПЭ равномерно распределено по всему телу, и можно оперативно получить пробу крови. Частота встречаемости дицентриков на одну клетку, оцененная при помощи соответствующей кривой острая доза-эффект *in vitro*, обеспечивает достоверную оценку средней поглощенной дозы всего тела. Однако на практике такие идеальные обстоятельства редко имеют место, а распространенными являются длительные или фракционированные облучения. Аварийное облучение чаще бывает неравномерным и может захватывать лишь часть тела. Взятие пробы крови для исследования хромосом может также произойти с существенной задержкой. Эти факторы приведут к неоднородности популяции отбираемых лимфоцитов, и сравнение полученного выхода дицентриков со стандартной *in vitro* кривой доза-эффект даст нереалистичную оценку дозы. Вследствие неоднородности получают выход дицентриков, не соответствующий распределению Пуассона, и в общем случае с чрезмерно большим разбросом. Для частичного облучения тела очевидной причиной несоответствия является тот факт, что лимфоциты тканей, не попавших в область облучения, не будут повреждены. В случаях высоко локализованного облучения меньшее, чем ожидалось, число поврежденных клеток могут содержать по несколько аберраций каждая. Даже когда доза облучения равномерна в коже, ее монотонное снижение с глубиной ткани приведет к множеству доз, получаемых лимфоцитами. Этот эффект будет особенно выражен для слабо проникающего излучения, но для более сильно проникающего излучения, такого как рентгеновское излучение 250 кВп или гамма-излучение источников  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{192}\text{Ir}$  и  $^{137}\text{Cs}$ , эффект достаточно мал для того, чтобы дицентрики имели приблизительно Пуассоновское распределение.

Аварийное облучение излучением с высокой ЛПЭ, таким как нейтронное излучение, также дает распределение с большим разбросом, определяемым тем, каким образом доза депонируется на клеточном уровне (см. Раздел 3).

Задержка в заборе крови сказывается на выходе аберраций, поскольку клетки, содержащие нестабильные аберрации, выходят из циркуляции и замещаются недавно сформировавшимися клетками, не содержащими дицентриков.

В данном Разделе рассматривается, как неравномерность облучения, отсроченный забор крови и растянутость облучения во времени влияют на выход хромосомных аберраций, и как эти данные можно использовать для получения значимой оценки дозы. Рассматриваются также сообщения о чрезвычайных ситуациях с очень низкими дозами, которые может быть трудно отличить от нулевой дозы из-за статистических ограничений.

Далее в следующем Разделе содержатся учебные примеры облучения в каждой из чрезвычайных ситуаций.

##### 9.7.4.1. Авария с возникновением критичности

При аварии с возникновением критичности организм облучается как нейтронами, так и гамма-лучами. Если отношение дозы от нейтронов к дозе от гамма-излучения известно – а эта информация обычно доступна из физических измерений – то можно оценить отдельные дозы от нейтронов и от гамма-излучения путем итерации. Итеративный процесс осуществляется следующим образом:

- 1) Предположить, что все аберрации вызваны нейтронами, и из измеренного выхода дицентриков оценить дозу по кривой для нейтронов;

- 2) Использовать оценку дозы от нейтронов и представленное отношение нейтронов к гамма-излучению для оценки дозы от гамма-излучения;
- 3) Использовать дозу от гамма-излучения для оценки выхода дицентриков, обусловленного гамма-излучением;
- 4) Вычесть этот вычисленный выход дицентриков от гамма-излучения из измеренного выхода дицентриков для получения нового значения для выхода от нейтронов;
- 5) Повторять шаги 1-4, пока не будут получены самосогласованные оценки.

В тех случаях, когда физическая оценка отношения «доза от нейтронного излучения : доза от гамма-излучения» не доступна, вышеупомянутый метод неприменим. Один из возможных подходов состоит в том, чтобы выразить дозу в Гр-экв, как было сделано для пострадавших в аварии в Токай-мура. Однако Брейм и Гроер [136] описали байесовский подход к оценке дозы для аварий с возникновением критичности, который позволяет оценить дозу в отсутствие оценки указанного отношения. Байесовский метод в моделируемой аварийной ситуации дал результаты, очень близкие к классическому методу итераций [137].

#### *9.7.4.2. Случаи переоблучения с низкой дозой*

Часто утверждается, что нижний предел обнаружения дозы при помощи дицентриков для излучения с высокой ЛПЭ составляет ок. 0,1-0,2 Гр. Чувствительность к низким дозам является функцией фонового уровня дицентриков (который для населения в целом имеет порядок ок. 0,5–1/1000 клеток) и предельного числа метафаз, которые можно реально подсчитать. Таким образом, для низких доз оценки дозы имеют большую статистическую неопределенность. Как рассматривалось выше, причиной неопределенности является в основном пуассоновская погрешность в выходе, а вклад SE в коэффициенты кривой доза-эффект, из которых самым важным в низких дозах является  $\alpha$ , мал. На практике коэффициентом  $\alpha$  можно пренебречь, за исключением случаев, когда калибровочные данные при низких дозах являются разреженными.

В то время как значение 100-200 мГр не вызывает большой озабоченности с точки зрения медицинских последствий облучения, с юридической точки зрения это большая доза по сравнению с рекомендуемой МКРЗ максимальной годовой профессиональной дозой 20 мЗв. На цитогенетику часто оказывают давление, с тем чтобы попытаться выявить подозреваемые небольшие превышения дозы, пожалуй, за пределами возможностей метода.

Опыт показывает, что когда сообщаются результаты, неспециалисты редко понимают, что такое неопределенность. Есть много подходов, которые можно использовать для облегчения интерпретации результатов. Во-первых, хотя это не строго точно статистически, можно объяснить, что вероятность превышения дозой верхней границы 95%-ого доверительного интервала составляет лишь 2,5%. Кроме того, для определения «предела обнаружения» количественного анализа можно использовать нижнюю границу доверительного интервала: в Таблице 9 доза, статистически превышающая чем 0 Гр, будет показана лишь 4 или более дицентриками на 1000 клеток, то есть когда нижняя граница доверительного интервала превышает 0 Гр.

ТАБЛИЦА 9. 95%-ЫЙ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЙ ИНТЕРВАЛ ДОЗЫ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ НИЗКИХ ВЫХОДОВ ДИЦЕНТРИКОВ НА 1000 КЛЕТОК И ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ, ПОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЕРОЯТНОСТИ НУЛЕВОЙ ДОЗЫ ИЛИ 0,25 Гр  
(дозы рассчитаны при  $Y = 0.0010 + 0.0164D + 0.0492D^2$ ),

| Наблюдение<br>(дицентрики) | Доза (Гр)                                     |         |  | Отношение<br>шансов<br>$p(0 \text{ Гр}):p(0,25 \text{ Гр})$ |
|----------------------------|---|---------|--|---|
|                            | Нижняя граница<br>доверительного<br>интервала | Среднее | Верхняя граница<br>доверительного<br>интервала |   |
| 0                          | —   | 0       | 0,12   | 1306 : 1  |
| 1                          | 0   | 0       | 0,18   | 160 : 1   |
| 2                          | 0   | 0,05    | 0,23   | 20 : 1  |
| 3                          | 0   | 0,09    | 0,26   | 2 : 1   |
| 4                          | 0,01  | 0,13    | 0,30   | 1 : 3   |
| 5                          | 0,03  | 0,16    | 0,33   | 1 : 28  |
| 6                          | 0,06  | 0,19    | 0,36   | 1 : 229   |
| 7                          | 0,09  | 0,22    | 0,38   | 1 : 1868  |

Альтернативно, если Вы рассматриваете лишь два возможных сценария: нулевая доза или подозреваемая доза (например, доза по пленочному дозиметру), относительные вероятности каждого из них можно использовать для вычисления отношения шансов для этих двух доз. Шансы выводятся из распределения Пуассона следующим образом. Если доза была равна нулю, то из кривой доза-эффект ожидается фоновая частота 1 дицентрик на 1000 клеток. Для дозы 0,25 Гр ожидается выход 8,2/1000. Из распределения Пуассона относительный шанс отсутствия наблюдения дицентриков при ожидаемых 1 и 8,2 составляет  $e^{-1}/e^{-8.2}$ , что равно 0,36788/0,00027, что составляет приблизительно 1300. Значения средней, нижней и верхней границы доверительного интервалов по дозе, плюс отношение шансов для нулевой дозы: дозы по пленочному дозиметру, показаны в верхней строке Таблицы 9, с другими значениями ниже, которые указывались бы для других значений наблюдаемых дицентриков на 1000 клеток.

Лаборатория, сообщающая о результатах анализа, может использовать один или оба из этих подходов, поскольку решение зависит от конкретных обстоятельств рассматриваемого случая.

#### 9.7.4.3. Частичное облучение тела

Цитогенетическим признаком частичного облучения тела является непуассоновское распределение дицентриков среди подсчитанных метафаз пациента. Поэтому первым этапом является вычисление отношения дисперсии к среднему ( $\sigma^2/y$ ), а далее использование  $\chi$ -критерия для определения того, значительно ли отклоняется данное отношение от единицы (см. Раздел 8.3). Если данные распределяются по Пуассону, то рекомендуется сообщить усредненную оценку дозы всего тела. Для данных, имеющих непуассоновское распределение, были предложены два метода (см. ниже), при использовании которых оценку дозы частичного облучения тела можно вывести, а не просто взять усредненное значение для всего тела. Стимул для определения оценки

частичной дозы облучения тела может также быть основан на информации об обстоятельствах события, где была получена повышенная доза. Рекомендуемым методом оценки пуассоновского распределения данных является и-критерий, но многие полагают, что этот критерий является не очень функциональным, особенно в случаях, когда подсчитывается низкое число метафазных пластинок. Поэтому во многих лабораториях стандартной практикой является также сравнение оценок дозы для всего тела и для части тела, используя для данных один из двух методов, описанных ниже. Если оценка дозы облучения всего тела существенно отличается от оценки дозы частичного облучения тела, то лаборатория должна рассматривать данный случай как потенциальный сценарий частичного облучения тела. В случаях неопределенности относительно того, имеются ли существенные различия между оценкой дозы облучения всего тела и оценкой дозы частичного облучения тела (Раздел 9.7.3), рекомендуется использовать описанные здесь два метода только в том случае, если распределение данных значительно отличается от непуассоновского.

### **Метод 1**

Этот метод был впервые предложен Долфином [138], и он получил название смешанный метод Пуассона. В нем учитывается избыточная дисперсия распределения дицентриков по всем подсчитанным клеткам. Считается, что наблюдаемое распределение является суммой (а) пуассоновского распределения, которое представляет облученную часть тела, и (б) оставшейся необлученной части. Совершенно очевидно, что клетки, содержащие аберрации, будут находиться в облученной части тела. Неповрежденные клетки будут включать две субпопуляции: от необлученной части тела и от облученных клеток, которые не получили повреждений (представляют первый член ( $e^{-Y}$ ) ряда Пуассона). Ур. (12) описывает распределение повреждений в клетках:

$$\frac{Y_F}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (12)$$

где:

$Y_F$  – средний выход дицентриков в облученной фракции,  
 $e^{-Y}$  представляет число неповрежденных клеток в облученной фракции,  
 $X$  - число наблюдаемых дицентриков,  
 $N$  - общее количество клеток,  
 $n_0$  - число клеток, не содержащих дицентриков.

Ур. (12) можно решить путем итерации для получения оценки максимальной вероятности выхода, а далее можно использовать  $Y_F$  для вычисления  $f$  – доли подсчитанных клеток, которые были облучены, при помощи Ур. (13):

$$Y_F f = \frac{X}{N} \quad (13)$$

Далее можно вычислить дозу в облученной части тела, используя  $Y_F$  и соответствующую калибровочную кривую. Размер облученной части тела можно вывести из  $f$  после корректировки на эффекты интерфазной гибели и задержки митоза. Вследствие действия этих факторов облученные клетки, даже не содержащие аберраций, будут иметь меньшую вероятность достигнуть метафазы за 48 часов в культуре, чем необлученные клетки. Если доля облученных клеток, которые достигают метафазы, была  $p$ , то часть облученного тела,  $F$ , получают как

$$F = \frac{f / p}{1 - f + f / p} \quad (14)$$

Значение  $p$  оценивают уравнением

$$P = \exp(-D/D_o) \quad (15)$$

где:

$D$  – оцененная доза,

и имеются экспериментальные данные, что значения  $D_o$  лежат между 2.7 и 3.5 [139, 140].

Однако этот подход имеет ряд ограничений:

- 1) Метод предполагает, что облученная часть тела была облучена равномерно.
- 2) Получают лишь ту долю облученных лимфоцитов, которая может быть связана с облученной частью тела, делая упрощающее предположение, что лимфоциты равномерно распределены по всему телу.
- 3) Требуется достаточно высокая местная доза, с тем чтобы можно было наблюдать несколько клеток, где число дицентриков составляет два или больше. Это необходимо для вычисления облученных, но неповрежденных клеток с наилучшим соответствием.
- 4) При данном методе принимается минимальная задержка между облучением и забором крови, с тем чтобы выход дицентриков не был значительно разбавлен только что образовавшимися неповрежденными клетками, вводящими в циркуляцию. Если происходит разбавление, то облученная часть тела, полученная этим методом, вероятно, будет недооценена [141].

## Метод 2

Этот подход был предложен Сасаки и Мията [142] и назван методом Qdr. В нем рассматривается выход дицентриков и колец только от тех клеток, которые содержат нестабильные аберрации, и предполагается, что эти клетки присутствовали во время аварии. Поэтому данный метод оставляет в стороне проблемы разбавления неповрежденными клетками из необлученной части тела или проблемы пополнения из пула стволовых клеток после облучения. Он также не требует присутствия значительно поврежденных клеток, содержащих две аберрации или больше. Qdr - ожидаемый выход дицентриков и колец среди поврежденных клеток,  $N_U$ , и определяется как

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - \exp(-Y_1 - Y_2)} \quad (16)$$

где:

$X$  - число дицентриков и колец,

$Y_1$  и  $Y_2$  - выходы дицентриков плюс колец и избыточных ацентриков, соответственно.

Поскольку  $Y_1$  и  $Y_2$  являются известными функциями дозы и их получают из кривых доза-эффект *in vitro*, Qdr - функция одной лишь дозы, и, следовательно, позволяет получить оценку дозы для облученной части тела.

С этим методом также связан ряд ограничений:

- 1) Предполагается, как и в методе 1, что облученная часть тела была облучена равномерно, но, согласно Сасаки и Мията [142], здесь не предоставляется информация о размере этой части. Однако ее можно вывести, используя по существу ту же самую процедуру, что и в методе 1, пересчитывая дозу в выход и затем используя Ур. (13) и (14).



- 2) Предполагается, что избыточные ацентрические aberrации также имеют распределение Пуассона, но это не подтверждается данными экспериментов *in vitro*. Если считать это ограничение важным, его можно избежать, рассматривая выход дицентриков и колец в тех поврежденных клетках, которые содержат только дицентрики и кольца. Ур. (16) теперь сводится к виду

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - \exp(-Y_1)} \quad (17)$$

который идентичен Ур. (12). Этот упрощенный вид уравнения даст оценку дозы, идентичную полученной вышеописанным методом 1.

- 3) Предполагается, что все клетки, содержащие нестабильные aberrации, присутствовали во время облучения, и что не было никакого поступления клеток, содержащих хромосомные aberrации, возникшие в результате повреждения хроматид в стволовых клетках.

#### 9.7.4.4. Отсроченное взятие крови

Имеются хорошие документальные свидетельства того, что некоторые лимфоциты, содержащие aberrации, продолжают существовать в периферийной циркуляции крови в течение многих лет после облучения. Однако показано, что задержка свыше нескольких недель между облучением и забором крови уменьшала выход aberrаций. Это особенно очевидно после больших доз, которые достаточно высоки для того, чтобы вызвать ранние детерминированные реакции, такие как снижение числа лейкоцитов. Для более низких доз, ниже порога детерминированного эффекта, вероятность задержки в распознавании повышенной дозы больше. Поэтому необходимо внести некоторую корректировку для получения более реалистической оценки дозы. К сожалению, вывести достоверный поправочный коэффициент не позволяет малое количество данных. Действительно, поскольку имеется выраженная вариабельность между отдельными людьми в зависимости от таких факторов, как инфекции, угнетение выхода aberrаций, вероятно, нельзя выразить просто как функцию одного лишь времени. Тем не менее, была предложена экспоненциальная скорость исчезновения с полупериодом приблизительно три года [106]. Это представляется приемлемым в качестве общего приближения при длительной задержке в заборе крови, например, пять лет или больше. Однако при исследовании коротких аварийных облучений столь длительные задержки случаются редко. Как правило, они колеблются от нескольких дней до нескольких недель. Задержка в несколько недель вероятна, если факт облучения осознают лишь при стандартной проверке индивидуального дозиметра, а само облучение произошло раньше, вскоре после выдачи дозиметра. Самая длительная задержка забора крови, с которой можно столкнуться, составляет один год, и для этого срока полупериод экспоненциального исчезновения продолжительностью около трех лет является неприемлемым.

Вероятно, самым всеобъемлющим массивом данных являются данные, опубликованные Бактоном и др. [63, 143, 144]. Они больше 30 лет неоднократно облучали группу пациентов фракционным рентгеновским облучением для лечения анкилозирующего спондилита. В их исследованиях был длинный горизонтальный начальный участок кривой выхода aberrаций, который длился ок. 20 недель, после чего следовало крутое падение, сохранявшееся больше четырех лет. Исследователи вычислили, что за первые четыре года выход дицентриков падал со скоростью ок. 43% в год, а после этого снижение составляло ок. 14% в год. Ввиду значительной вариабельности в ограниченном объеме данных, каких-либо твердые рекомендации дать невозможно, особенно для задержек свыше нескольких недель. Поэтому неоткорректированные выходы дицентриков, вероятно, вызовут недооценку дозы, но степень недооценки зависит от обычно не поддающихся количественному определению факторов, для каждого человека своих.

При рассмотрении частичного облучения тела было отмечено (Раздел 9.7.4.3 выше), что метод Qdr учитывает выход дицентриков и колец только в поврежденных клетках. Таким образом, применение этого метода при отсроченном заборе крови может также предотвратить проблему разбавления со временем неповрежденными клетками, поступающими в циркуляцию, при условии, что по-прежнему наблюдается достаточные количества клеток, содержащих нестабильные aberrации. Разумеется, это невыполнимо при очень длительных задержках. Однако в таких случаях может оказаться возможным учитывать персистенцию клеток со стабильными aberrациями. В течение многих лет это было возможно лишь путем кариотипирования большого количества препаратов, окрашенных блоком, и далее прошедших бэндинг. При исследовании анкилозирующего спондилита этими методами было выявлено, что уровень этих клеток оставался более или менее постоянным в течение 30 лет последующих наблюдений. Ава [145] также сообщил о хорошей корреляции между частотой стабильных aberrаций и оценками дозы по системе DS86 у лиц, выживших после атомной бомбардировки. Делящиеся клетки, содержащие нестабильные aberrации, выборочно элиминируются за счет нерасхождения при митозе. Появление со временем избытка устойчивых aberrаций объясняется предположением, что клетки со стабильным и нестабильным повреждением исчезают с одинаковой скоростью, но потеря стабильного повреждения компенсируется беспрепятственными делениями из пула стволовых клеток. Трудоемкое кариотипирование с бэндингом теперь заменено методом FISH как оптимальным методом скрининга большого количества клеток на присутствие редких, случайных, неконституциональных стабильных транслокаций для ретроспективной биологической дозиметрии. Это рассматривается в Разделе 10.

#### 9.7.4.5. Растянутое во времени и фракционированное облучение

Растянутое во времени или фракционированное облучение могут также вызвать более низкий выход хромосомных aberrаций, чем если бы та же самая доза была бы получена в остром облучении. Для излучения с высокой ЛПЭ, где отношение доза-эффект близко к линейному, какого-либо эффекта мощности дозы или фракционирования не ожидается. Однако для излучения с низкой ЛПЭ эффект растягивания дозы состоит в уменьшении коэффициента квадрата дозы  $\beta$  в выходе в Ур. (2). Этот член представляет те aberrации, возможно, с происхождением от двух треков, которые могут быть изменены за счет механизмов репарации, у которых есть время для срабатывания в течение растянутого периода облучения или в периоды между интермиттирующими острыми облучениями. В ряде исследований было показано, что уменьшение частоты aberrаций, похоже, подчиняется единой экспоненциальной функции со средним временем ок. 2 часов. Большинство повреждений, преобразующихся в хромосомные aberrации, репарируются или иным образом становятся недоступными для взаимодействий в течение приблизительно пяти-шести часов после облучения.

Зависящий от времени коэффициент, известный как функция G, был предложен Ли и Кечезидом [146], с тем чтобы включить модификацию коэффициента квадрата дозы, и таким образом учитываются эффекты растягивания дозы во времени. Линейно-квадратичное Ур. (2) можно преобразовать, как показано в Ур. (18):

$$Y = C + \alpha D + \beta G(x) D^2 \quad (18)$$

где

$$G(x) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + e^{-x}] \quad (19)$$

и

$$x = t/t_0 \quad (20)$$

где:

$t$  - время, в течение которого происходило облучение,

$t_0$  - средняя продолжительность разрывов, которая, как показано, составляла ок. 2 часов [96, 147].

Поэтому в случае непрерывного облучения необходимо знать продолжительность времени, в течение которого происходило облучение, и сделать упрощающее допущение, что мощность дозы во время облучения оставалась более или менее постоянной. К этой процедуре стоит прибегать лишь в том случае, если суммарная доза достаточно велика, а продолжительность облучения составляет от нескольких часов до нескольких дней. Совершенно очевидно, что при малых облучениях ( $< 0,3$  Гр) излучением с низкой ЛПЭ, даже в острой форме, большинство aberrаций образуются при прохождении единственных ионизирующих треков, так что выход в любом случае аппроксимируется к  $Y = \alpha D$ . Когда доза получена в течение длительного периода,  $G(x)$  фактически сводится к нулю. Поэтому даже если речь идет о большой дозе ( $> 1,0$  Гр), выход в действительности становится  $Y = \alpha D$ . Для кратких интермиттирующих облучений, где интервалы между фракциями составляют свыше шести часов, облучения можно рассмотреть как ряд отдельных острых облучений, для каждого из которых индуцированные выходы aberrаций являются аддитивными. Для более коротких интервалов между фракциями  $G(x)$  в Ур. (18) может быть заменено на  $\exp(-t_1/t_0)$ , где  $t_1$  - время между фракциями. Экспериментальные данные, поддерживающие гипотезу функции  $G$ , были представлены Ллойдом и др. [96] и Бочингером и др. [147].

#### 9.7.4.6. Внутреннее инкорпорирование радионуклидов

Это определенный вид тип растянутого во времени облучения с тем дополнительным осложнением, что облучение тела обычно очень неравномерно. Это связано с тем, что места депонирования радионуклида и время удержания радионуклида зависят от большого количества факторов. Они включают маршрут входа в организм, физико-химическую форму, качество испускаемого излучения, метаболические пути, в которые нуклид может быть включен, и физиологическое состояние пациента.

Хромосомные aberrации, превышающие фоновые уровни, могут наблюдаться в лимфоцитах, взятых у людей, которые имеют внутреннее радиоактивное заражение. Однако из-за многих вмешивающихся факторов невозможно использовать выход aberrаций для получения значимой оценки дозы облучения во всем теле или в определенных органах. Выход aberrаций можно соотнести с кривой доза-эффект, для которой лимфоциты облучались определенным радионуклидом *in vitro*, и это может позволить получить оценку дозы в циркулирующих лимфоцитах пациента *in vivo*. Такой пример был приведен Дюфреном и др. [148] для несчастного случая, когда человек получил массивное радиоактивное заражение  $\text{Am}^{241}$ . Однако доза в лимфоцитах, особенно в случае альфа-излучателей, может чрезвычайно исказить дозу в других клетках и тканях тела.

Таким образом, цитогенетические исследования имеют, как правило, ограниченное значение в случаях внутренне инкорпорированных радионуклидов. Исключения существуют, когда радионуклиды распределяются достаточно равномерно по всему телу. Изотопы цезия и тритиевая вода - два таких примера. Цезий обычно концентрируется в мышцах, которые имеют достаточно равномерное распределение, и имеет двухфазное выведение с 10%-ой элиминацией с полупериодом 2 дня и 90%-ой элиминацией в течение 100 дней. Нуклидом, который распространился среди группы населения во время события в Гоянии, был  $^{137}\text{Cs}$  [149, 150], и он был одним из главных составляющих дозы от радиационного загрязнения окружающей среды в Чернобыле [151]. Тритий в виде

тритиевой воды или газа инкорпорирован в воду организма человека и таким образом дает более или менее равномерное облучение. Его биологический период полувыведения составляет приблизительно 10 дней, поэтому, как с цезием, облучение можно рассматривать как хроническое и на практике можно ожидать линейной кривой доза-эффект. В отсутствие определенной кривой доза-эффект *in vitro* для трития будет достаточно кривой для рентгеновского излучения ок. 200-300 кВп. Проссер и др. [152] продемонстрировали относительную биологическую активность 1,13 при низких дозах или мощностях доз для трития применительно к рентгеновскому излучению 250 кВп.

### 9.7.5. Примеры оценок дозы

#### 9.7.5.1. Острое облучение всего тела

Брюен и др. [91] и Престон и др. [153] описали аварию, в которой был задействован источник  $^{60}\text{Co}$ , и в которой большая доза была получена довольно равномерно по передней части тела. Средняя доза в спине была ниже, но спина была также облучена, поскольку человек повернулся и ушел от источника. Суммарное время облучения составляло меньше минуты. Было взято несколько образцов крови с интервалом от шести часов до трех лет после события. Выход аберрации оставался довольно постоянным за период от 6 часов до 32 дней, в течение которого было взято 7 образцов крови и было проанализировано 300 метафаз от каждого образца. При объединении данных для 7 образцов наблюдалось 478 дицентриков и колец в 2100 клетках. Эти исследователи использовали кривую доза-эффект гамма-излучения *in vitro*, где доза  $D$  была выражена в рентгенах (R):

$$Y = 3.93 \times 10^{-4} D + 8.16 \times 10^{-6} D^2 \quad (21)$$

для оценки среднего облучения всего тела 144 R (1 R = 0,0095 Гр). Это хорошо согласуется с физической оценкой 127 R, полученной по термолюминесцентному дозиметру, который человек носил, и реконструкции случая при помощи фантома. Отмеченные общие гематологические изменения также согласовывались с облучением ок. 150 R.

#### 9.7.5.2. Авария с возникновением критичности

Рассмотрим аварию с возникновением критичности, в которой подсчитано 100 клеток и наблюдаются 120 дицентриков, то есть 1,2 дицентрика на клетку. Отношение нейтронного излучения к гамма-излучению, полученное из физических измерений, составляет 2:3 в поглощенной дозе. Необходимо получить цитогенетические оценки дозы при помощи калибровочных кривых для 0,7 МэВ нейтронов спектра деления и гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$ . Уравнения выхода для этих кривых:

$$\text{Нейтронное излучение: } Y = 0,0005 + 8,32 \times 10^{-1} D \quad (22)$$

$$\text{Гамма-излучение: } Y = 0,0005 + 1,64 \times 10^{-2} D + 4,92 \times 10^{-2} D^2 \quad (23)$$

После этапов, перечисленных в Разделе 9.7.4.1, имеем:

- 1) 1,20 дицентриков на клетку эквивалентно 1,44 Гр нейтронного облучения;
- 2)  $1,44 \times 3/2 = 2,16$  Гр гамма-излучения;
- 3) 2,16 Гр гамма-излучения эквивалентно 0,266 дицентрикам на клетку;
- 4)  $1,20 - 0,266 = 0,934$ , что является выходом дицентриков за счет нейтронного облучения;
- 5) 0,934 дицентрика на клетку эквивалентно 1,12 Гр нейтронного облучения.

При повторении шага 2,  $1,12 \times 3/2 = 1,683$  Гр гамма-излучения и т.д. После нескольких итераций были получены дозы 1,21 Гр нейтронного облучения и 1,82 Гр гамма-излучения. Полная последовательность операций изложена в Таблице 10.

В работах [137, 154] описана *in vitro* валидация этого подхода, где показано, что в международных работах были получены очень хорошие оценки фактических доз от нейтронного и гамма-излучения для сравнения дозиметрии аварий с возникновением критичности.

ТАБЛИЦА 10. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭТАПОВ ПОЛУЧЕНИЯ ОЦЕНОК ДОЗЫ ДЛЯ СМЕШАННОГО ГАММА И НЕЙТРОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

| Этапы 1 и 5                | Этап 2               | Этап 3                       | Этап 4                       |
|----------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Доза нейтронного облучения | Доза гамма-облучения | Выход гамма-излучения        | Выход нейтронного-излучения  |
| (Гр)                       | (Гр)                 | (к-во дицентриков на клетку) | (к-во дицентриков на клетку) |
| 1,44                       | 2,16                 | 0,266                        | 0,934                        |
| 1,12                       | 1,68                 | 0,167                        | 1,032                        |
| 1,24                       | 1,86                 | 0,201                        | 0,999                        |
| 1,20                       | 1,80                 | 0,189                        | 1,011                        |
| 1,21                       | 1,82                 | 0,194                        | 1,006                        |

#### 9.7.5.3. Переоблучение низкой дозой

Специалист по неразрушающей дефектоскопии, работающий с источниками  $^{192}\text{Ir}$ , возвратил месячный термолюминесцентный дозиметр, который зарегистрировал облучение проникающим излучением 250 мЗв. Дозиметры всех коллег, регулярно - работавших рядом с ним, не регистрировали облучения. Не было никаких данных о каких-либо системных отказах или какого-либо другого объяснения высокой дозы дозиметра. Случай был направлен на цитогенетический анализ, при котором было подсчитано 1000 метафаз, и все они были неповрежденными. Было сообщено, что наилучшая оценка дозы равна нулю, но при использовании кривой  $Y = 0,001 + 0,0164D + 0,0492D^2$ , нуль соответствовал верхней границе 95%-го доверительного интервала 0,12 Гр. Исследователи выразили сомнение в том, что человек действительно получил облучение, поэтому здесь оказалось целесообразным представить результаты другим образом. Используя метод отношения шансов, описанный в Разделе 9.7.4.2, получили шансы в пользу нуля приблизительно 1300:1.

#### 9.7.5 4. Острое неравномерное облучение

Человек, не занятый радиационно-опасной деятельностью, подвергся неравномерному облучению высокой локализации, вызвавшему ожоги кожи, что произошло, когда человек поднял источник  $^{192}\text{Ir}$  активностью 250 ГБк (6,7 Ки) и положил его в карман [155]. Оперативно были взяты пробы крови, и была исследована одна тысяча метафаз лимфоцитов; из них 99 содержали следующие нестабильные аберрации: 86 дицентриков, 2 центрических кольца и 60 избыточных ацентриков. Дицентрики имели следующее распределение:

ТАБЛИЦА 11. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДИЦЕНТРИКОВ ПОСЛЕ ОСТРОГО НЕРАВНОМЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

|             | К-во дицентриков на клетку |    |   |   |   |   |
|-------------|----------------------------|----|---|---|---|---|
|             | 0                          | 1  | 2 | 3 | 4 | 5 |
| К-во клеток | 932                        | 56 | 9 | 1 | 1 | 1 |

Кривые *in vitro* доза-эффект лаборатории, проводящей исследование, были:

$$Y_{dicentric} = 1.57 \times 10^{-2} D + 5.00 \times 10^{-2} D^2 \quad (24)$$

$$Y_{acentric} = 2.30 \times 10^{-2} D + 3.90 \times 10^{-2} D^2 \quad (25)$$

Используя смешанный метод Пуассона (Раздел 9.7.4.3, Метод 1), оценку максимальной вероятности для выхода дицентриков  $Y_F$  в облученных клетках получают подстановкой данных из примера в Ур. (12). Путем итерации получают  $Y_F = 0,489$  дицентрика на облученную клетку, что соответствует значению 2,97 Гр на кривой доза-эффект.

Размер облученной доли  $f$  получают решением Ур. (13), которое в данном примере дает  $f = 0,176$ . Поскольку это значение представляет популяцию клеток, которая была облучена и выжила, оно должно быть скорректировано, как описано в Ур. (14), с тем чтобы учесть при выборе облученных клеток такие факторы, как интерфазная гибель и задержка митоза. Имеются некоторые экспериментальные данные [147], указывающие, что этот выбор является экспоненциальной функцией дозы, с  $D_0 = 2,70$  Гр. В данном примере оценка дозы ок. 3,0 Гр может предполагать, что лишь ок. 0,33 облученных клеток ( $p$  в Ур. (14)) выжили и были проанализированы. Первоначально облученная часть  $F$  равна 0,393 и получена путем решения Ур. (14). После округления облученная часть тела составляет ок. 40%, а средняя доза ок. 3,0 Гр.

Применительно к методу Qdr (Раздел 9.7.4.3) следует отметить, что исследовательская лаборатория, как правило, не использовала выход дицентриков плюс колец для оценки дозы, а использовала одни лишь дицентрики, то есть Qd. Поскольку кольца являются редко наблюдаемыми абберациями по сравнению с дицентриками и избыточными ацентриками, эта модификация имеет лишь тривиальный эффект. Поэтому, подставляя значения в Ур. (16) и опуская центрические кольца, получаем:

$$Qd = \frac{86}{99} = \frac{1.57 \times 10^{-2} D + 5.00 \times 10^{-2} D^2}{1 - e^{-3.87 \times 10^{-2} D - 8.90 \times 10^{-2} D^2}} \quad (26)$$

Уравнение можно решить для  $D$  итерацией и получить оценку дозы 3,19 Гр. Это хорошо согласуется со значением 2,97 Гр, полученным при использовании смешанного метода Пуассона.

#### 9.7.5.5. Отсроченный забор крови

Ниже представлены два примера вычисления дозы для случаев отсроченного забора крови.

##### Корректировка выхода дицентриков

Штефан и др. [156] сообщили о несчастном случае, в котором два мужчины получали довольно равномерное облучение в течение приблизительно пяти минут от источника гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$ . Они носили дозиметры, показавшие 470 и 170 мЗв, и эти значения очень хорошо согласовывались с физическими вычислениями доз. К сожалению, забор крови был задержан на 215 дней для человека, получившего более высокую дозу, и на

103 дня для его коллеги. Было исследовано ок.1500 метафаз от каждого человека, и были получены почти идентичные выходы, 0,47 и 0,46 дицентриков на 100 клеток. Они соответствуют 0,13 Гр на кривой доза-эффект:

$$Y = 3.00 \times 10^{-4} D + 5.00 \times 10^{-6} D^2 \quad (27)$$

Авторы решили скорректировать выходы дицентриков на  $\times 3$  и  $\times 2$ , соответственно, чтобы учесть задержки. Это решение было основано на данных Брюена и др. [91] и Престона и др. [153], полученных для аварийного облучения всего тела, описанного в Разделе 9.7.5.1. Скорректированный выход дицентриков дал оценки дозы 0,31 и 0,22 Гр. Хотя это дает биологическую оценку дозы для более сильно облученного человека, более близкую к физической оценке, некоторое расхождение по-прежнему остается. Если бы авторы решили использовать данные о задержке из исследования больных анкилозирующим спондилитом [143], можно было бы применить поправку максимум 1,4, с тем чтобы расхождение между биологической и физической оценками для первого человека было больше. Поскольку эффект для больных анкилозирующим спондилитом продолжался до 20 недель, задержка в 103 дня не потребовала бы никакой корректировки.

#### *Использование метода Qdr*

Ишихара и др. [157] описали серьезный несчастный случай, когда источник рентгеновского излучения  $^{192}\text{Ir}$  был взят в жилище и облучил шесть человек. Два наиболее серьезно переоблученных человека получили частичное облучение тела, которое было выражено ожогами кожи. Это было далее отражено в данных об абберациях, где дозы, оцененные по методу Qdr, составили 1,95 и 1,50 Гр, что существенно выше значений 1,52 и 0,54 Гр – доз облучения всего тела, соответственно, полученных из значений выходов дицентриков и колец на одну клетку. Значения дицентриков и колец на клетку несколько различались в течение первых двух месяцев после облучения, но далее вплоть до шести месяцев стали более стабильными. Для сравнения, значения Qdr остались относительно постоянными с самого начала до 400 и 200 дней, соответственно, когда дальнейшее исследование прекратили.

#### *9.7.5.6. Растянутое во времени и фракционированное облучение*

В декабре 1998 г. серьезный несчастный случай произошел в Стамбуле, где на складе металлолома был вскрыт отработавший радиотерапевтический источник  $^{60}\text{Co}$  [158]. Десять человек получили облучение, в основном в течение одного дня; продолжительность времени облучения составляла от 2 до 7 часов [159]. Один из облученных рассматривается здесь в качестве примера. Его облучение продолжалось 7 часов, а частота дицентриков, по сводным результатам четырех лабораторий, составила 157 дицентриков в 688 клетках =  $0,228 \pm 0,18$  дицентриков на клетку. Из кривой острая доза-эффект

$$Y = 0.001 + 0.003D + 0.060D^2 \quad (28)$$

оценка острой дозы ( $\pm \text{SE}$ ) =  $1,7 \pm 0,1$  Гр. Неопределенность здесь несколько упрощена, поскольку пренебрегли любыми погрешностями на кривой доза-эффект. Применяя функцию G, где

$$x = \frac{t}{t_0} = \frac{7}{2} = 3.5 \quad (29)$$

получаем  $G(x) = 0,413$ , и теперь кривая доза-эффект становится

$$Y = 0.001 + 0.003D + 0.025D^2 \quad (30)$$

Частота дицентриков теперь соответствует 7-часовому облучению  $2,5 \pm 0,1$  Гр.

#### 9.7.5.7. Внутренняя инкорпорация радионуклидов

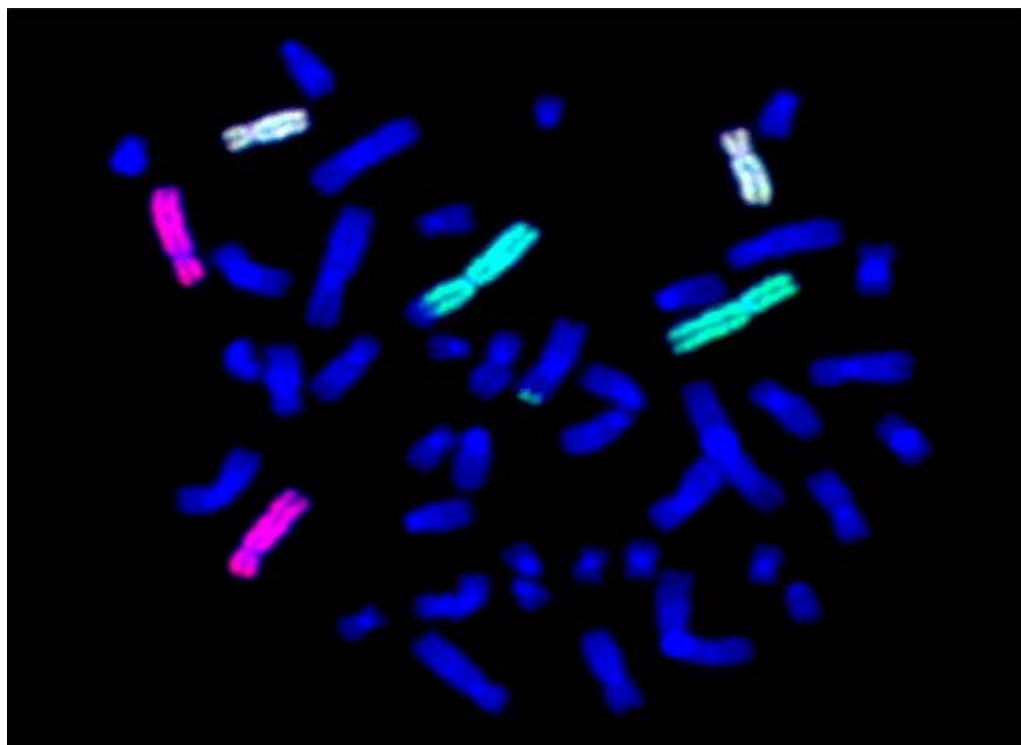
Ллойд и др. описали случайную ингаляцию приблизительно 35 ГБк (~1 Ки) каплей тритиевой воды заводской работницей [160]. Удаление трития из ее организма было ускорено принудительным диурезом. Ожидаемая доза в мягкой ткани была получена путем измерения концентрации и скорости выведения трития в ее моче. Выходы дицентриков измерялись в пробах крови, взятых в разное время после события, и данные, полученные через 40–50 дней, использовались для биологической дозиметрии, поскольку к тому времени вся ожидаемая доза была получена. Выходы дицентриков были соотнесены с линейным *in vitro* калибровочным коэффициентом доза-эффект,  $5,37 \times 10^{-2} \text{D}$ , и была получена оценка средней дозы в лимфоцитах 0,58 Гр. Это значение требовало дальнейшего умножения на коэффициент 0,66. Данный коэффициент учитывает различное содержание воды во всем теле, в мягких тканях и в лимфоцитах. Выход аберраций калибруется относительно дозы в лимфоцитах, в то время как тритиевая вода доставляет дозу преимущественно в мягкие ткани организма. Эта поправка дала биологическую оценку дозы 0,38 Гр с 95%-ым доверительным интервалом 0,48 и 0,28 Гр, являющуюся более реалистичным сравнением со значением  $0,47 \text{ Гр} \pm 20 \%$ , полученным из измерений мочи. При пересчете концентрации трития в моче в дозу к мягких тканях также учитывалось содержание воды в мягких тканях [160].



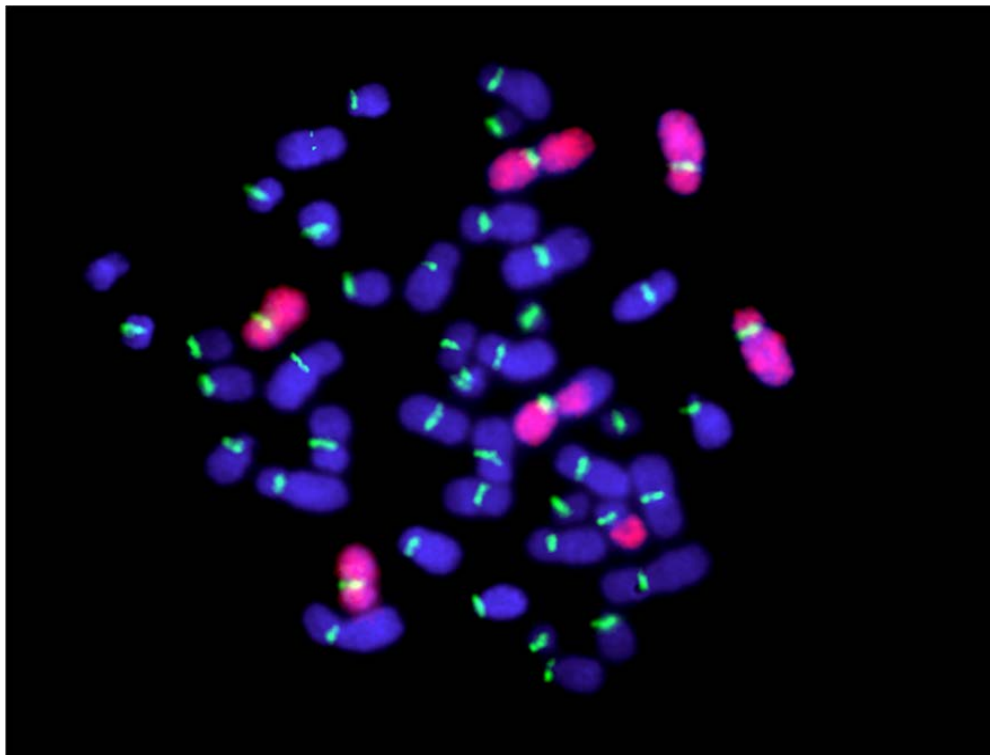
## 10. АНАЛИЗ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Один из признанных недостатков анализа дицентриков и микроядерного теста с блокированием цитокинеза (CBMN) состоит в том, что повреждения являются нестабильными, и, следовательно, элиминируются из пула лимфоцитов периферической крови со скоростью обновления клеток (см. Раздел 4). Давно признано, что требуется анализ для более стойких типов повреждений, например, стабильных транслокаций, с тем чтобы использовать биологическую дозиметрию для старых или долговременных облучений. Транслокации можно обнаруживать путем кариотипирования, которое, однако, слишком трудоемко, чтобы рутинно применяться в биологической дозиметрии. Внедрение анализа FISH [161] открыло возможность обнаруживать транслокации альтернативным способом.

Этот метод использует определенные последовательности ДНК, которые можно применять как зонды для определенной части генома, и использовать различные флуорохромы для выделения или «окрашивания» областей в различные цвета. Во флуоресцентном микроскопе транслокации наблюдаются как окрашенные перестройки (показано на Рис. 26 и 27).

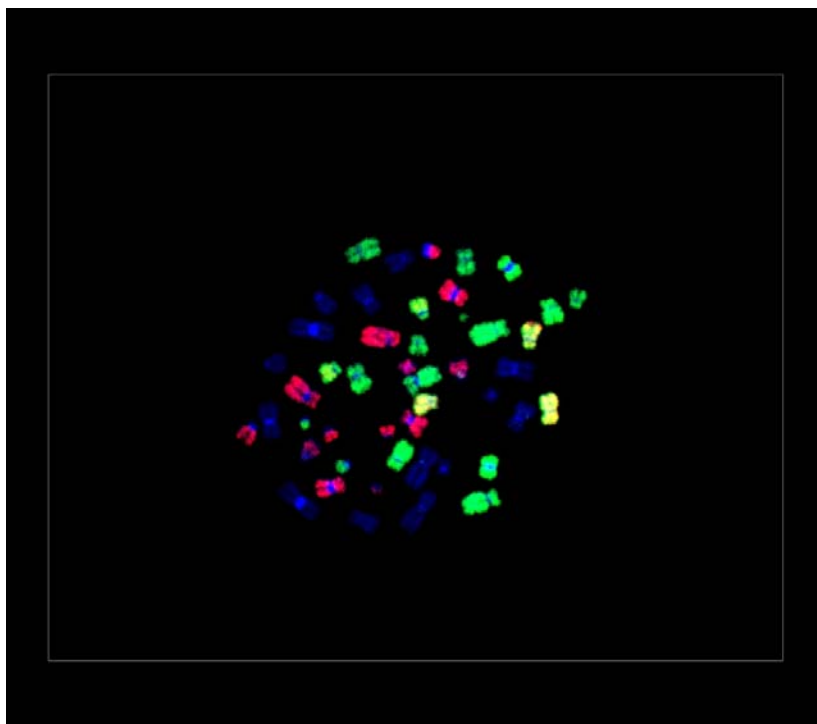


*РИС. 26. Метафаза человека с цветными окрашенными хромосомами #2 (FITC, зеленый), #4 (техасский красный) и #8 (FITC+ техасский красный, желтый), а остальные контрастно окрашены красителем DAPI. Наблюдается простая по виду транслокация, или двунаправленная транслокация  $[t(Ba), t(Ab)]$ , затрагивающая хромосому #2.*

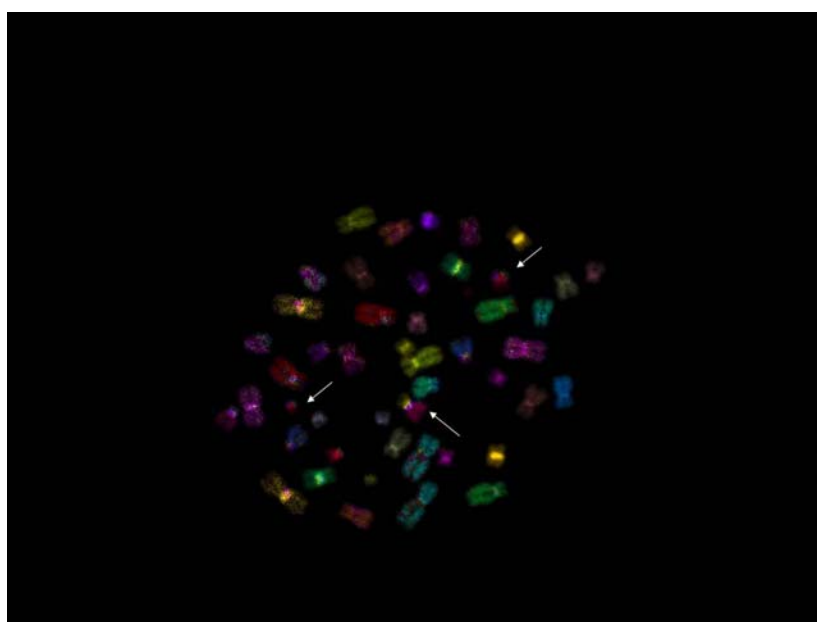


*РИС. 27. Метафаза человека с одноцветно окрашенными хромосомами #1, #4 и #11, меченными Cy3 (красный), центромеры выделены при помощи панцентромерного зонда, меченного FITC (зеленый), а остальные контрастно окрашены красителем DAPI. Наблюдается простая по виду транслокация, или двунаправленная транслокация [ $t(Ba)$ ,  $t(Ab)$ ], затрагивающая хромосому #1.*

У анализа FISH есть много применений в медицине и в фундаментальной цитогенетике. Однако в данной публикации будет рассматриваться лишь его применение в биологической дозиметрии. В настоящее время имеется большое разнообразие зондов, поэтому можно для каждой хромосомы человека селективно окрашивать всю хромосому целиком или ее ограниченные области. Нанесение флюорохромов в различных отношениях на определенные места позволяет одновременно выделять различные области в широком диапазоне цветов. Один из недостатков использования большого числа цветов, например, в процедуре многоцветного FISH (mFISH), состоит в том, что различия в оттенках могут быть слишком тонкими для различения человеческим глазом. Поэтому требуется, чтобы электронные системы выполняли захват изображений и показывали их с нанесенной искусственной расцветкой (Рис. 28 и 29).



*РИС. 28. Вид метафазы, окрашенной по методу mFISH. А: в красном-зеленом-синем цвете, как сфотографировано камерой.*



*РИС. 29. Вид метафазы, окрашенной по методу mFISH. В: та же самая метафаза, но каждой паре хромосом присвоен псевдоцвет.*

#### 10.1. ПРОЦЕДУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ФИКСАЦИИ

Процедуры получения крови, культивирования лимфоцитов и сбора фиксированных клеток аналогичны тем, которые описаны для анализа дицентриков (Разделы 9.1 и 9.2). Хотя транслокации стабильны в процессе митоза, тем не менее хорошим практическим подходом является выполнение анализа на метафазах М1. Это особенно важно потому, что потеря в процессе митоза клеток, содержащих нестабильные aberrации, может исказить среднюю частоту транслокаций. Кроме того, могут быть случаи, когда от одной

и той же пробы крови требуется как частота стабильных транслокаций, так и частота нестабильных дицентриков. Для анализа FISH лучше использовать хранящиеся в холодильнике фиксированные суспензии клеток. Клетки, размещенные на предметные стекла микроскопа, можно хранить. Их необходимо хранить при температуре -20°C, но даже в этом случае иногда отмечалось ухудшение их состояния. Для перевозки в другие лаборатории более удобны фиксированные суспензии клеток.

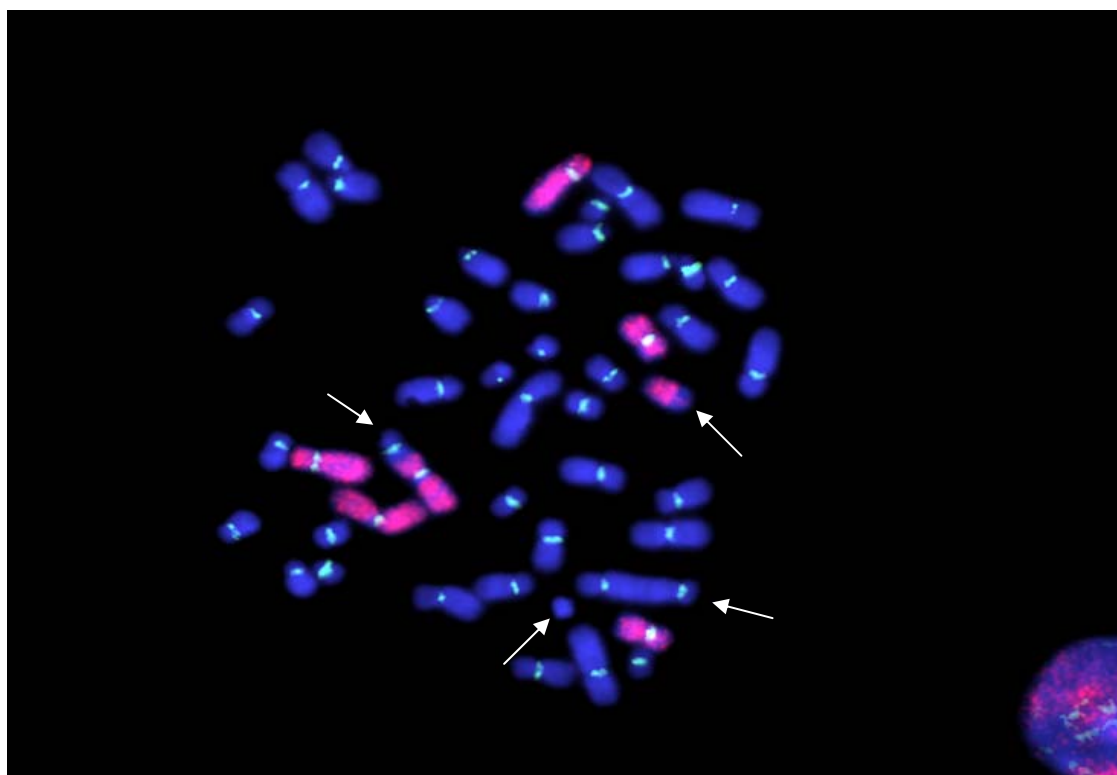
В общем случае для биологической дозиметрии окрашивается лишь часть генома (например, три пары хромосом). Отсюда требование подсчитывать больше метафаз, чем подсчитывалось бы при использовании анализа дицентриков. Следовательно, целесообразно и экономически эффективно производить препараты, в каждом из которых будет содержаться большое количество метафаз, поддающихся подсчету.

## 10.2. ОКРАШИВАНИЕ ХРОМОСОМ

Используя комбинации зондов и флюорохромов, коммерчески доступных в настоящее время, хромосомы можно выделять при помощи метода, известного как многоцветный FISH (mFISH) [162]. Он позволяет выполнять полное кариотипирование, и, таким образом, подсчет всех межхромосомных транслокаций. Можно также отдельно выделять центромеры и теломеры всех хромосом.

Внутрихромосомные обмены, такие как перичентрические инверсии, могут быть обнаружены при селективном окрашивании плеч р и q хромосомы в различные цвета [163], а перестановки внутри одного плеча могут быть обнаружены методом mBAND, когда создается многоцветный бэндинг вдоль хромосомы [164, 165]. Было предложено рассматривать повышенную частоту внутренних обменов по сравнению с внешними обменами как характерный признак эффекта излучения с высокой ЛПЭ [166], и поэтому данные методы имеют целенаправленное применение для исследования эффектов качества излучения.

Для большинства применений ретроспективной биологической дозиметрии достаточно обнаружить лишь межхромосомные транслокации, и mFISH в идеале может обеспечить максимум информации от каждой метафазы. Его можно также расширить для выделения отдельных плеч хромосомы различными цветами (pq-mFISH) [167], но это дорогая и трудоёмкая процедура, требующая наличия сложной системы получения изображения и системы манипуляции. Поэтому возникла практика окрашивать ограниченное количество пар хромосом либо одним и тем же цветом, либо отдельными цветами, и контрастно окрашивать остальные хромосомы. Для более точного различения дицентриков и транслокаций рекомендуется использовать панцентромерный зонд [168] одновременно с окрашиванием целых хромосом (рис. 30).



*Рис. 30. Метафаза человека с одноцветно окрашенными хромосомами #1, #4 и #11, меченная Su3 (красный), центромеры выделены панцентромерным зондом, меченным FITC (зеленый), а остальные контрастно окрашены красителем DAPI. Наблюдается простой по виду дицентрик [dic(BA),ace(ab)], затрагивающий хромосому #1. Также присутствует дицентрик плюс ацентрик в контрастно окрашенных хромосомах.*

В общем случае, окрашивание трех больших хромосом (т.е. от #1 до #12 – см. рис. 7), представляющих приблизительно 20% генома (см. Таблицы 2 и 3), при использовании одного цвета дает эффективность обнаружения транслокаций ок. 33%. Процент генома, который окрашивается каждым коктейлем, относительно полного генома, оценивается от физической длины хромосом [169]. Частота транслокаций полного генома может быть оценена согласно стандартной формуле, предложенной Лукасом и др. [170], которая действительна при допущении о простых парных обменах. Желательно не включать хромосомы #7 или #14 в комбинации зондов, поскольку транслокации и другие aberrации, затрагивающие эти хромосомы, могут возникнуть *in vivo* во время иммунологического развития и могут таким образом исказить количественный анализ эффекта излучения [171, 172].

При ретроспективной биологической дозиметрии одноцветный FISH представляется достаточным для трехсоставного коктейля целевых хромосом. Многоцветное окрашивание триплета увеличивает эффективность обнаружения (если хромосомы #1, #4 и #12 выделены из приблизительно 31-34%), и дает лучшее обнаружение сложных транслокаций, с которыми можно столкнуться после недавнего облучения с высокой дозой. Уравнения, приведенные ниже в Разделе 10.4 для пересчета в эквивалентность полного генома, могут относиться как к одноцветному, так и многоцветному окрашиванию.

### 10.3. КРИТЕРИИ ПОДСЧЕТА

#### 10.3.1. Выбор клеток для подсчета

Несмотря на отсутствие устойчивого консенсуса по вопросу о том, на каких метафазах следует выполнять подсчет, хорошо распластанные метафазные клетки считают подходящими для подсчета, если клетки выглядят интактными, центромеры обнаруживаются морфологически и присутствуют во всех окрашенных хромосомах, а флюорохромное мечение достаточно ярко для обнаружения обменов между хромосомами, меченными различными цветами [107].

Обычно полноту контрастно окрашенных хромосом не учитывают, но большинство исследователей отклоняют метафазу, если в ней явно пропущены несколько хромосом, например, <40 объектов.

Некоторые исследователи полагают, что следует подсчитывать весь присутствующий окрашенный материал, хотя при этом требуется определенная степень суждения, поскольку пределы разрешающей способности технологии FISH на текущий момент составляют приблизительно 11-15 миллионов п.о. [173]. Вследствие этого некоторые симметричные транслокации выглядят похожими на неполные обмены, но исследования с теломерными зондами показали, что большая часть кажущихся неполными транслокаций являются полными [62]. Те клетки, которые являются очевидно дефицитными в большей части окрашенного материала или меченых центромер, должны быть исключены из подсчета.

Для ретроспективной дозиметрии было показано, что частоты транслокаций в стабильных клетках, определенных как клетки без дицентриков, центрических колец или ацентриков, являются постоянными во времени [64, 174]. Поэтому для каждой транслокации рекомендуется регистрировать, встречается ли она в стабильной или нестабильной клетке.

#### 10.3.2. Номенклатура и регистрация данных

Для описания аберраций хромосом, обнаруженных при окрашивании, были независимо разработаны две специальные системы номенклатур, и также использовались описания, основанные на традиционной терминологии обычного цитогенетического подсчета [173, 175-178]. Эти системы номенклатур были введены потому, что для частичного анализа генома обычная терминология оказалась недостаточной, поскольку многие структуры, выявленные методом FISH, оказались более сложными, чем ожидалось.

- (i) Система, названная сокращением P<sub>A</sub>I<sub>N</sub>T (от «Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology»), была разработана для полного описания каждого абберантно окрашенного объекта в метафазе [175]. Поэтому каждый объект описывается индивидуально без перекрестной ссылки на другие абберантные объекты в клетке. Каждый цвет обозначается буквой, начинаясь в алфавитном порядке с контрастной окраски. Заглавная буква обозначает компонент, содержащий центромеру. Таким образом, при одноцветном окрашивании t(Ab) является двуцветным объектом, состоящим из центромерной части контрастно окрашенной хромосомы и нецентромерной части окрашенной хромосомы. В свою очередь, t(Ba) представляет собой объект, где центромера находится на окрашенном компоненте. Для многоцветного окрашивания в номенклатуру включены и другие буквы. Полное описание всех сокращений, используемых в системе, см. в Такер и др. [175]. Еще одно предложение, сделанное в [175], о количестве стыков цветов как показателе повреждений, связанных с дозой, не имеет практического применения в ретроспективной дозиметрии.

- (ii) Савадж и Симпсон (S&S) [176, 177] предложили терминологию, включающую цифры и буквы, для описания каждого обмена во всей полноте. Цифры относятся к количеству объектов, содержащих окрашенный материал, а алфавитный порядок букв показывает ожидаемую встречаемость данных структур. Эта так называемая система S&S относится лишь к одноцветно окрашенным структурам. Однако ее можно использовать для структур с двухцветным и трехцветным окрашиванием, но каждая окрашенная хромосома должна подсчитываться отдельно, независимо от цветов партнеров [131]. Эта номенклатура широко используется при изучении механизмов действия, в частности, например, для понимания сложных перестановок.

Можно использовать более традиционную терминологию, где транслокации называются реципрокными, терминальными и интерстициальными [179]. Первые две также называют полными или двунаправленными и неполными или однонаправленными транслокациями, соответственно. Третья включает инверсии и инсерции. Полная/неполная или реципрокная/терминальная – это термины, относящиеся к механизму действия. Для задач биологической дозиметрии, вероятно, лучше всего говорить о двунаправленных или однонаправленных транслокациях, исключительно на основе их внешнего вида, без каких-либо указаний на механизмы действия. Действительно, исследования механизмов показали, что однонаправленные структуры не обеспечивают надежной оценки неполноты обмена [180]. Инсерция – один из многих типов сложной перестройки, которые формально определяются как результат трех или более разрывов двух или более хромосом [177].

Вышеописанные номенклатуры являются не взаимоисключающими, а скорее взаимодополняющими, и в [175] выполнено сравнение номенклатур для общего набора данных.

В настоящее время наиболее широко используемым методом регистрации данных является описание каждой аномальной метафазы как элемента при помощи номенклатуры PAINT [175], но несколько модифицированным способом [178], где учитываются основные механизмы образования aberrаций. Используются сокращения системы PAINT, но отмечаются связи между объектами в метафазе, и таким образом включаются также компоненты обычной терминологии. Хромосомные aberrации классифицируются как простые или сложные, причем последние учитываются, когда для образования наблюдаемой аномалии требуется три или более разрывов в двух или более хромосомах. Aberrации считаются полными, когда все разорванные части воссоединены, а неполными, когда одна или более частей оказались невоссоединенными.

Например,  $t(Ba)$ , видимая вместе с  $t(Ab)$ , рассматривается как простая полная или двунаправленная транслокация, а любая из этих структур сама по себе рассматривается как простая неполная или однонаправленная транслокация, если она видна сама по себе в метафазе, иногда с соответствующим окрашенным ацентриком,  $t(Ba)$  плюс  $ace(b)$ . Комплексы регистрируются как таковые, и описываются либо как инсерции, например  $ins(Aba)$ , или как более сложные перестройки, как  $t(Ba)$  с  $ace(ab)$  или  $dic(BA)$  с  $a t(Ab)$ .

Следует отметить, что если окрашивать ограниченное число хромосом, то такие aberrации как  $t(Ba)$  плюс  $t(Ab)$  рассматривают как «видимо» простые aberrации. Слово «видимо» используется потому, что они кажутся простыми, но они могли возникнуть из сложных aberrаций, однако это можно определить лишь при окрашивании полнохромосомного комплемента по методу mFISH [181, 182].

#### 10.4. ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Лукас и др. [170] вывели уравнения для вычисления эквивалентности генома, которые были далее обобщены Лукасом и Денгом [183].

Частоту геномных транслокаций обычно вычисляют при помощи формулы для окрашенных фракций генома [32] следующим образом:

$$F_G = \frac{F_p}{2.05 f_p (1 - f_p)} \quad (31)$$

где:

$F_G$  - частота aberrаций полного генома,

$F_p$  - частота транслокаций, выявленная методом FISH,

$f_p$  - гибридизированная фракция генома, [170], с учетом пола пациентов.

Это более полно рассматривается ниже в Разделе 10.4.1.

Пересчет данных на эквивалентность полному геному рекомендуется использовать, когда данные должны быть объединены, или когда выполняются межлабораторные сравнения результатов различных исследований, в которых использовались различные комбинации зондов окрашивания целых хромосом. Делается предположение, иногда называемое формулой Лукаса, что вероятность вовлеченности какой-либо определенной окрашенной хромосомы в aberrацию пропорциональна ее содержанию ДНК. Этот вопрос интенсивно исследовался [184-186], и в основном признается, что при данном предположении получаем обоснованное приближение. Однако существует консенсус в отношении того, что при использовании (содержания ДНК) в формуле Лукаса оценка участия более крупных хромосом в простых обменных aberrациях часто может быть завышена по сравнению с меньшими хромосомами [187, 188]. Поэтому более точные результаты дает использование в формуле Лукаса (содержание ДНК)<sup>2/3</sup>, а не (содержание ДНК). Некоторые авторы утверждали, что этот вид пропорциональности может быть характерен для обменов, относящихся прежде всего к хроматину у границы хромосомной территории [186-188]. Наилучшие данные по относительно содержанию ДНК в хромосомах человека приводятся Мортонем [32], и значения, показанные в Таблицах 2 и 3, были вычислены из данных, приведенных в его Таблице 4, столбец 2.

##### 10.4.1. Одноцветное окрашивание

Фракция генома  $f$  окрашена (зеленый цвет), а все остальное  $1 - f$  является контрастно окрашенным (синий цвет).

*Примечание:*  $f_p$  из Ур. (31) здесь для простоты сокращено до  $f$ .

|       |             |                       |
|-------|-------------|-----------------------|
| Будет | $f^2$       | зелено-зеленые обмены |
|       | $(1 - f)^2$ | синие-синие обмены    |
|       | $2f(1 - f)$ | синие-зеленые обмены  |
|       | Итого       | 1,00                  |

Однако это итоговое количество включает обмены внутри одной и той же хромосомы, например инверсии. Общее количество межхромосомных обменов составляет 0,974, если использовать то же самое предположение о пропорциональности ДНК (см. вычисления у Лукаса и др. [170]). Таким образом, доля всех транслокаций, которые являются синими-зелеными, дается Уравнением (32):



$$\frac{F_P}{F_G} = \frac{2f(1-f)}{0.974} = 2.05f(1-f) \quad (32)$$

где:

$F_P$  и  $F_G$  – частота транслокаций, измеренная методом FISH, и частота транслокаций всего генома, соответственно.

Та же формула относится к синим-зеленым дицентрикам.

*Пример:*

Предположим, что окрашены пары хромосомы 1, 2 и 4. Их соответствующее содержание ДНК (мужчина) из Таб.2 составляет 0,0828, 0,0804 и 0,0639.

Следовательно,  $f = 0/2271$ , поэтому  $F_P/F_G = 0,360$ .

Эта комбинация окрашенных хромосом на 36% эффективна при измерении двуцветных транслокаций. Поэтому для получения выхода транслокаций всего генома наблюдаемый выход делится на 0,36.

#### 10.4.2. Двуцветное окрашивание

Предположим, что фракция  $f_1$  окрашена в красный цвет, другая фракция  $f_2$  окрашена в зеленый цвет, а  $(1 - f_1 - f_2) = f_3$  контрастно окрашена в синий цвет.

|        |           |                       |
|--------|-----------|-----------------------|
| Будет: | $f_1^2$   | красно-красные обмены |
|        | $f_2^2$   | зелено-зеленые обмены |
|        | $f_3^2$   | синие-синие обмены    |
|        | $2f_1f_2$ | красно-зеленые обмены |
|        | $2f_1f_3$ | красно-синие обмены   |
|        | $2f_2f_3$ | зелено-синие обмены   |

Полные межхромосомные обмены снова составляют 0,974, и, следовательно, доля всех двуцветных транслокаций определяется как

$$\frac{2(f_1f_2 + f_1f_3 + f_2f_3)}{0.974} - 2.05[f_1(1-f_1) + f_2(1-f_2) + f_3(1-f_3)] \quad (33)$$

*Пример*

Предположим, что пары хромосом 1, 2 и 4 окрашены в красный цвет; пары 3, 5 и 6 окрашены в зеленый цвет, а остальные контрастно окрашены в синий цвет. Фракциями из Таблицы 2 являются  $f_1 = 0,227$  и  $f_2 = 0,186$ :

$$\frac{F_P}{F_G} = 2.05(0.175 + 0.151 - 0.042) = 2.05(0.284) = 0.582 \quad (34)$$

Эта комбинация на 58% эффективна в обнаружении транслокаций. Следует отметить, что там, где встречается двунаправленный обмен между двумя по-разному окрашенными хромосомами, он все равно считается лишь одним событием.

### 10.4.3. Больше двух цветов

Эти вычисления могут быть расширены на метод FISH с многоцветным окрашиванием. Для большого числа цветов уравнение становится

$$\frac{F_P}{F_G} = 2.05 \left[ \sum_i f_i (1 - f_i) - \sum_{i < j} f_i f_j \right] \quad (35)$$

Все вычисления, рассмотренные в этом разделе, заложены в программное обеспечение оценки дозы, упомянутое в Разделе 8.3.

### 10.5. КОНТРОЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Контрольные уровни для транслокаций выше, чем для дицентриков, и до некоторой степени это объясняется тем, что транслокации являются персистирующим типом aberrаций. Поэтому при попытках ретроспективной биологической дозиметрии важно принимать во внимание фон транслокаций, особенно после низких доз.

Разумеется, контрольный образец крови до облучения случайно облученного лица или исследуемой группы населения недоступен, и поэтому приходится пользоваться предполагаемыми значениями, основанными на общих данных обследования. Идеально лаборатории следовало бы создать свою собственную контрольную базу данных, но это трудоемкая работа, учитывая, что необходимо принимать во внимание целый ряд факторов, искажающих результаты, и особенно широкий диапазон возрастных групп. Всесторонний мета-анализ, опубликованный Сигурдсоном и др. [107], в настоящее время является лучшей международной базой данных с разбивкой по возрасту, полу, расе и привычке к курению. Сюда входят данные более раннего исследования, объединяющего результаты некоторых европейских лабораторий [189].

Из обоих исследований представляется очевидным, что возраст является основным фактором, определяющим фоновую частоту транслокаций, которая существенно повышается после 60 лет (Рис. 31).

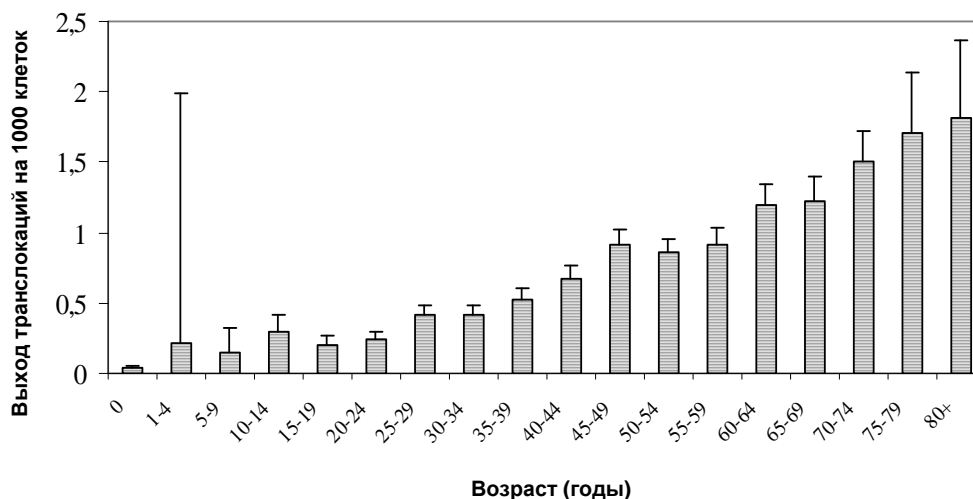


РИС. 31. Число транслокаций как функция возраста [107].

Важно принимать во внимание фон и вычитать из числа транслокаций, наблюдаемых в лимфоцитах человека, частоту транслокаций, ожидаемую для возраста этого человека.

В дополнение к подтвержденному эффекту лаборатории, исследование Сигурдсона и др. [107] показало значительную вариабельность между четырьмя основными географическими зонами. С другой стороны, не наблюдалось никакого эффекта этнической принадлежности или пола. Таким образом, для изучения факторов, влияющих на частоту транслокаций, представляется очень важным сравнивать лишь данные одной и той же лаборатории.

Среди немногих исследований, в которых сообщается о влиянии пола на частоту транслокаций [107, 189, 190], лишь в работе Уайтхауса и др. [189] показана более высокая частота транслокаций у мужчин, чем у женщин в возрастной группе 20-29 лет, что существенно отличается от возрастной группы 30-39 лет ( $p < 0,05$ ). Для других возрастных групп у женщин была более высокая частота, чем у мужчин, хотя это различие не было существенным. В других исследованиях, в которых изучается эффект пола, не найдено доказательств каких-либо различий [107, 190, 191], даже в возрастных группах.

В то время как исследования единодушно приходят к выводу, что частота транслокаций повышается с возрастом, результаты приводимого ниже обзора литературы показывают, что эта тенденция для некоторых других факторов не столь ясна (Таблица 12).

ТАБЛИЦА 12. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДОВАННЫХ ФАКТОРОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ТРАНСЛОКАЦИЙ И ДИЦЕНТРИКОВ

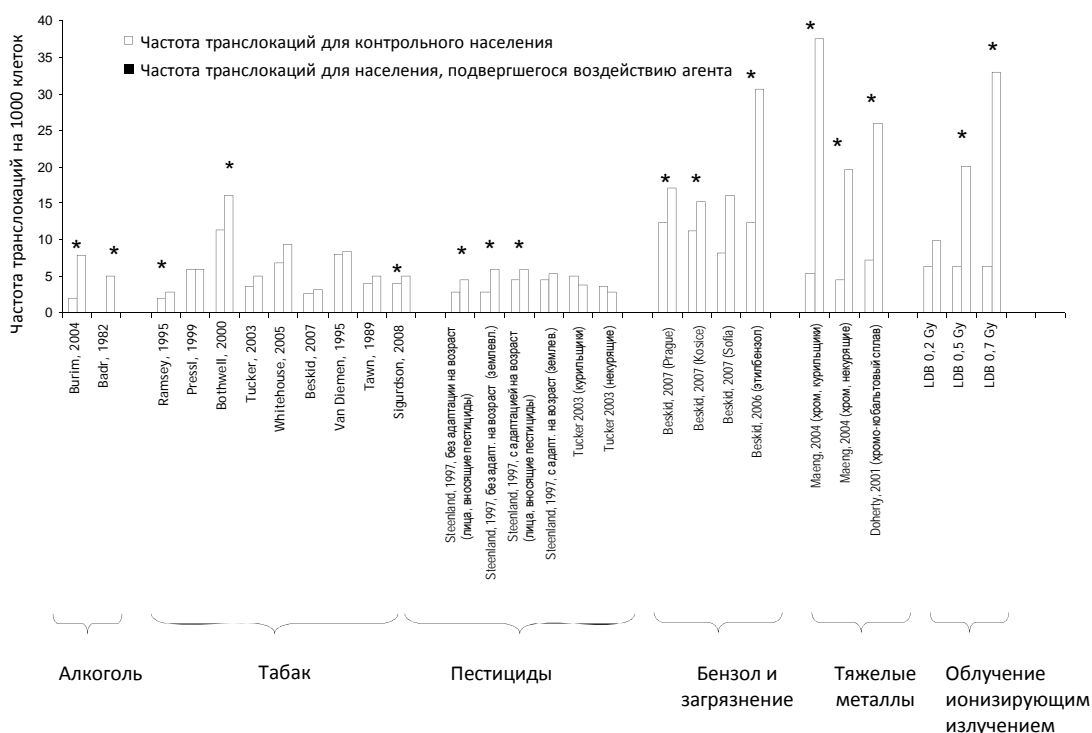
| Отягощающий фактор         | Значительные исследования и соответствующие ссылки | Дополнительные ссылки                   |
|----------------------------|--|---|
| Алкоголь                   | Бадр и Хуссейн [192]                               |   |
|                            | Бурим и др. [193]                                  |   |
|                            | Рэмси и др. [191]                                  | Тон и Картмел [195]                     |
|                            | Ботуэлл и др. [194]                                | Ван Димен и др. [196]                   |
|                            | Сигурдсон и др. [107]                              | Прессль и др. [190]                     |
| Табак                      |  | Такер и др. [197]                       |
|                            |  | Уайтхаус и др. [189]                    |
|                            |  | Менг и др. [198]                        |
|                            |  | Бескид и др. [199]                      |
|                            |  | Плат и др. [200]                        |
| Пестициды                  | Стинленд и др. (аппликаторы) [201]                 | Такер [197]                             |
|                            | Смит и др. ( $> 31 \text{ ppm}$ ) [203]            | Ким и др. [202]                         |
| Бензол                     |  | Смит и др. ( $< 31 \text{ ppm}$ ) [203] |
|                            |  | Занг и др. [204]                        |
| Индустриальное загрязнение | Бескид и др. [199]                                 | Бескид и др. [205]                      |
|                            | Срам и др. [206]                                   |   |
| Тяжелые металлы            | Менг и др. (Хром, лишь курильщики) [198]           | Дюлу и др. (Мышьяк) [208]               |
|                            | Доэрти и др. (Хром) [207]                          | Менг и др. (Хром, лишь некурящие) [198] |

Избыток транслокаций часто создавался только алкоголем в обоих из исследований, где это рассматривалось. Эта тенденция не наблюдалась для курения (8/11 исследований) или пестицидов (1/2 исследований). Случай бензола является особым, поскольку исследования выполнялись для хромосом, которые вовлечены в болезни, специфически связанные с облучением. Это означает, что обмены лишь между двумя хромосомами (#8 и #21 или #14 и #18) были зарегистрированы в нескольких исследованиях [202–204]. Во всех трех сообщается о значительном эффекте, когда они изучили лишь частоту транслокаций  $t(8;21)$  и  $t(14;18)$ . Однако были идентифицированы три исследования, в которых были изучены транслокации между этими хромосомами и всеми другими, и ни одно из них не показало значительных результатов.

Вещества, которые люди употребляют – и которыми злоупотребляют – по собственному выбору, такие как табак, наркотики и алкоголь, влияют на транслокации лишь при повышенном и хроническом потреблении. Тем не менее, они часто индуцируют значительное увеличение частоты транслокаций при комбинации или связи с другими видами агентов (металлы и мутагенные химические соединения) [192]. Говоря о синергистических эффектах веществ, которыми люди злоупотребляют, в некоторых исследованиях предполагается, что курение увеличивает частоту транслокаций, вызванных профессиональным воздействием какого-либо вредного агента. Так обстоит дело для людей, подвергающихся воздействию ионизирующего излучения [194], пестицидов [197] и хрома [198]. Синергистический эффект курения особенно очевиден по тому, что большинство исследований эффектов одного лишь курения не показывают значительного увеличения частоты транслокаций. С другой стороны, для алкоголизма показать синергистический эффект более трудно, поскольку обычно алкоголики имеют не только одну эту зависимость, или по крайней мере потому, что число алкоголиков, не имеющих другой зависимости, слишком мало для сравнительного анализа с контрольной группой. Поэтому исследование воздействия на частоту транслокаций одного лишь алкоголизма дало бы весьма ценную информацию.

Влияние токсичных агентов, используемых на рабочем месте (пестициды, бензол и металлы), на число транслокаций часто пропорционально дозе и продолжительности воздействия. Было также показано, что воздействие комбинации агентов является более вредным, чем воздействие одного химического элемента. И наконец, была показана эффективность средств индивидуальной защиты (перчатки, маски, рабочие комбинезоны/спецодежда), наличие которых снижает частоту транслокаций у групп населения, подвергающихся воздействию мутагенов этого типа.

Рис. 32 иллюстрирует воздействие факторов, исследованных на предмет частоты вызываемых транслокаций, как функции вида фактора, воздействия/отсутствия воздействия и конкретного исследования.



LDB: Частота транслокаций, полученная в Лаборатории биологической дозиметрии (LBD) для данной радиационной дозы (Облучение кобальтом, мощность дозы 0/5 Гр/мин)

\* Исследования, где различие между группой, подвергшейся воздействию, и контрольной группой является существенным

РИС. 32. Сравнение частоты транслокаций, вызванных различными агентами, и частоты транслокаций, вызванных воздействием *in vitro*.

Для каждого исследования указана частота транслокаций на 1000 клеток в контрольном населении и в населении, подвергнутому воздействию агента. Кроме того, на схеме также представлена частота транслокаций, полученная после облучения *in vitro* образцов крови с дозами 0,2, 0,5 и 0,7 Гр, для сравнения частоты индуцирования транслокаций. Однако необходимо отметить, что облучения выполнялись в течение короткого периода времени, и это были острые облучения, тогда как воздействие алкоголя, курения, пестицидов или бензола является хроническим. Воздействие определяется как хроническое, когда человек подвергается воздействию генотоксичного агента в течение всей своей жизни или значительной ее части (воздействие как фактор образа жизни или профессиональной деятельности).

На Рис. 32 также показано, что частота транслокаций у населения, подвергающегося воздействию алкоголя, курения и пестицидов, значительно ниже показателей, измеренных для воздействия бензола и особенно для воздействия хрома. Кроме того, значения для контрольных групп относительно схожи со значениями, которые наблюдались в группах, подвергающихся воздействию алкоголя, курения и пестицидов. По сравнению с группой, подвергающейся ионизирующему излучению с дозой 0,5 Гр, частота транслокаций для лиц, подвергающихся воздействию алкоголя, курения и пестицидов, низки. Поэтому можно прийти к заключению, что если наблюдается высокая частота транслокаций, то ее можно отнести на счет радиационного облучения. С другой стороны, при проведении ретроспективного исследования облучения ионизирующим излучением среди лиц, подвергающихся в высокой степени воздействию хрома или бензола, будет невозможно отличить частоту радиологически-индуцированных транслокаций от экологически-индуцированных транслокаций. Однако подверженность воздействию бензола или хрома имеет место нечасто, и ее можно выявить путем соответствующего анкетного опроса, охватывающего прошлую и настоящую профессиональную деятельность человека.

## 10.6. ПЕРСИСТЕНЦИЯ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Самый большой недостаток метода дицентриков состоит в том, что выход аберраций у облученных лиц снижается с течением времени после облучения. Дицентрики, индуцированные в пуле циркулирующих лимфоцитов периферической крови, удаляются при гибели клеток и разбавляются при регенерации клеток крови. Они являются митотически нестабильными аберрациями, неспособными проходить через повторяющееся деление клеток. В отличие от них, транслокации обычно митотически стабильны, и, если клетка в целом стабильна ( $C_S$ ), то транслокации, индуцированные в стволовых клетках, могут пройти до созревания циркулирующих лимфоцитов. Первоначально транслокации индуцируются с частотой, аналогичной частоте индуцирования дицентриков, но именно их стабильность после облучения делает их более подходящими для ретроспективной биологической дозиметрии.

Постоянство частоты транслокаций долго было вопросом обсуждения. Спустя несколько лет после аварии в Гоянии (Бразилия) было обнаружено, что частота транслокаций была ниже частоты дицентриков, наблюдаемых сразу после облучения [209, 210]. Однако данные о начальном выходе транслокаций отсутствовали в обоих исследованиях. В ретроспективном исследовании персонала предприятия атомной промышленности «Маяк» (южный Урал), полученная оценка доз была в основном ниже, чем можно было бы прогнозировать, исходя из калибровочной кривой для передающихся простых по виду транслокаций [211]. Другие последующие исследования аварийно облученных лиц показали, что частота транслокаций оставалась относительно постоянной со временем. У лиц, облученных в Чернобыле, через 5-8 лет после аварии никаких существенных изменений в частоте транслокаций не наблюдались [212]. У лиц, получивших облучение всего тела при аварии в Эстонии, частота транслокаций оставалась довольно постоянной в течение двух лет, за исключением одного человека, подвергшегося длительному, но также неравномерному, облучению всего тела [213]. Однако спустя четыре года после аварии частота всех транслокаций в клетках, содержащих лишь простые перестройки, упала в среднем до 65% от их начального значения, но персистенция двунаправленных транслокаций была немного выше, чем для транслокаций в целом [214]. Снижение частоты транслокаций со временем было отнесено на частичное облучение тела и согласуется с идеей совпадающего распределения дицентриков и транслокаций при таких облучениях [215, 216]. Из этого может следовать, что при длительном времени после частичного облучения тела оценка дозы облучения всего тела обычно бывает ниже по мере возрастания дозы [215].

Более заметное уменьшение частоты транслокаций с течением времени после облучения, по мере возрастания дозы, было описано для других случаев аварийного облучения людей; частота транслокаций сохранилась со временем для доз ниже 1-3 Гр, но после более высоких доз наблюдалось ее уменьшение [217, 218]. У онкологических больных, получавших радиотерапию, наблюдалось выраженное снижение выхода транслокаций с течением времени после облучения, и оно было сильнее выражено у лиц с более высокой начальной частотой транслокаций [219-222]. Возможным объяснением этих наблюдений у пациентов, прошедших радиотерапию, является летальная доза в стволовых клетках и репопуляция этой области необлученными клетками из той части тела, которая не подверглась облучению. В целом, эти результаты указывают на то, что при больших дозах начальный выход транслокаций может не всегда оставаться постоянным с течением времени после облучения.

Полнота и сложность – это те факторы, которые могут влиять на исчезновение транслокаций с течением времени после облучения. Большинство сложных аберраций не является передающимися, и, как следствие, клетки, несущие такие аберрации, исчезают с течением времени после облучения [213, 215, 223-226].

Другим фактором, способствующим постоянству транслокаций, является совместное возникновение транслокаций и нестабильных аберраций в одной и той же клетке. Поэтому для ретроспективной оценки дозы была предложена процедура, при которой учитываются лишь устойчивые клетки, а не суммарное число клеток, и это предложение рассматривается. При последующем наблюдении пострадавших при аварии в Эстонии начальный выход транслокаций, когда учитываются все клетки, через 2 два года уменьшился приблизительно до 70% [214]. Однако дальнейшее исследование в той же самой группе, для которой были повторно проанализированы оцифрованные изображения поврежденных клеток для выбора клеток без нестабильных аберраций, показало, что через 7 лет выход транслокаций был аналогичен показателю первых двух лет. Однако это исследование было ограничено, поскольку при нем необходимо было опираться на те изображения клеток, которые были сохранены, потому что содержали повреждения в окрашенных хромосомах. Коррекция для тех клеток, которые первоначально рассматривались как «нормальные» относительно окрашенного материала, была невозможна, поскольку они не были переведены в цифровую форму. Однако из этого исследования, принятого с теоретической вероятностью, что после длительного периода времени остаются лишь стабильные клетки, следует, что целесообразней рассматривать выход транслокаций в стабильных клетках, чем выход транслокаций во всех клетках. Этот вопрос может быть в конечном счете разрешен лишь при параллельном проведении хороших последующих исследований вскоре после облучения для лиц, получивших облучение во время аварии, с использованием анализа FISH и анализа нестабильных аберраций.

#### 10.7. КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ

Для оценок дозы по транслокациям, обнаруживаемым методом FISH, каждая лаборатория должна создать свои собственные кривые. Математические аспекты подбора кривой такие же, как для дицентриков, что было описано ранее (Раздел 8.3). Кривую необходимо создавать с тем же самым коктейлем зондов FISH, который рутинно используется для исследования случаев реальных пациентов. При соблюдении этого требования отпадает необходимость пересчета в эквивалентность генома, который может внести некоторую дополнительную неопределенность.

Для излучений с низкой ЛПЭ, когда были построены калибровочные кривые для транслокаций с учетом стабильных клеток или всех клеток, в подобранных коэффициентах не было никаких различий, если рассматривались лишь очевидно простые транслокации [227, 228]. Однако во время анализа под микроскопом рекомендуется подсчитывать все аберрации, обнаруженные в полном наборе хромосом, а не только те, где задействован окрашенный материал [64]. Это даст возможность с уверенностью установить, дает ли использование одних лишь устойчивых клеток более реалистические оценки дозы.

Оценки дозы методом FISH обычно выполняются для случаев высоких, но растянутых во времени доз, или после низкого радиационного облучения много лет назад, в отсутствие медицинских симптомов. В отличие от дозиметрии острого облучения, где используется линейно-квадратичная кривая, здесь критически важен линейный член  $\alpha$  кривой доза-эффект. Для подтверждения достоверности линейного коэффициента можно использовать F-критерий, указанный в Разделе 8.3. Лишь у немногих опубликованных калибровочных кривых, если таковые вообще имеются, существует достаточный подсчет в диапазоне низких доз для получения достаточно достоверного линейного коэффициента при малом доверительном интервале [64]. Для построения линейной зависимости от дозы необходимо подсчитать несколько точек дозы ниже 1 Гр, каждая с большим числом клеток, а это весьма трудоемкая работа. Между тем, для решения этой проблемы можно сделать ряд обоснованных предположений. Отношение формирования дицентриков и

транслокаций составляет 1:1 [229, 230], и поэтому можно ожидать схожие коэффициенты доза-эффект. Как следует из различных опубликованных данных по дицентрикам, линейный коэффициент калибровки составляет ок. 15-20 транслокаций на 1000 геном-эквивалентных клеток на 1 Гр гамма-излучения высокой энергии [51]. Кроме того, известно, что на линейный член кривых доза-эффект влияет главным образом линейная передача энергии излучения, в то время как кривизна, обусловленная коэффициентом  $\beta$ , зависит от мощности дозы (как описано для коррекции G-члена в Разделе 9.7.4.5). Имеются свидетельства того, что линейный коэффициент, полученный для хронического облучения *in vitro*, если он получен при температуре тела, не отличается от значения, получаемого для линейного члена при острой дозе [233]. Таким образом, пока не будут получены достоверные линейные коэффициенты для транслокаций по методу FISH в экспериментах *in vitro* с калибровочными кривыми низкая доза-эффект, целесообразно использовать линейный член, полученный для того же качества излучения для калибровочных кривых для дицентриков при острых случаях.

При реконструкции дозы через долгое время после облучения оценка дозы будет базироваться на допущении, что лимфоциты, облученные *in vitro*, и стволовые клетки крови, облученные *in vivo*, покажут схожую частоту транслокаций. Нет уверенности в том, что стволовые клетки и зрелые лимфоциты имеют одинаковую радиочувствительность, или это может быть воздействие клеточного деления, при котором элиминируются клетки, содержащие нестабильные абберрации. В ретроспективной дозиметрии исходят из того, что вышеуказанные факторы не являются основными искажающими факторами, и из недавних публикаций следует, что этот аспект не имеет практического значения [64].

В заключение можно сказать, что реконструкция дозы на основе транслокаций в стабильных клетках является общепризнанным методом [174], но имеет ограничения. Представляется, что это хороший инструмент для случаев облучения, растянутых во времени и с низкой дозой, где преобладает линейный член калибровочной кривой. В качестве временной меры можно принять член из кривых доза-эффект для дицентриков. Если после облучения с высокой, особенно острой, дозой, ограничиваться лишь устойчивыми клетками, то можно недооценить дозу, поскольку число клеток с транслокациями в нестабильных клетках увеличивается вместе с числом сложных абберраций. Кроме того, есть предел по верхней дозе, относительно которого можно выполнять калибровку, поскольку клетки, не содержащие нестабильных повреждений, становятся все более и более редкими.

## 10.8. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНАЛИЗА FISH ДЛЯ РЕТРОСПЕКТИВНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

Эти исследования были предназначены для изучения осуществимости анализа транслокаций методом FISH для ретроспективной дозиметрии в отношении (1) популяций без предшествующего биологического и физического дозиметрического исследования; (2) популяций с известными физическими дозиметрическими оценками; и (3) популяций с известными биологическими дозиметрическими оценками, полученными при помощи традиционного анализа дицентриков сразу после облучения. Данные этой последней группы считаются самыми надежными для сравнения с частотой транслокаций с целью определения стабильности транслокаций.

Были отобраны четыре группы для проведения исследований в следующем составе (1) рабочие атомной электростанции; (2) население, живущее в загрязненных областях; (3) чернобыльские ликвидаторы; и (4) люди или группы людей, получившие случайное облучение.



### **10.8.1. Ретроспективная биологическая дозиметрия в группах населения без предшествующей индивидуальной дозиметрии**

Для получения ретроспективных оценок радиационных доз была определена частота хромосомных aberrаций у 15 лиц, о которых было известно, что они получили сильное облучение в результате Чернобыльской аварии, и всех их лечили как больных с признаками отсроченной стадии кожного радиационного синдрома.

Эти исследования начались в 1991 г. и последующие наблюдения продолжались до 1994 г. [212, 233, 234]. В 1991 г. были получены оценки биологической эквивалентной дозы, либо путем измерения частоты дицентрических и кольцевых хромосом методом Qdr, либо путем измерения частоты стабильных транслокаций методом FISH со сложными цельнохромосомно-специфичными библиотеками ДНК и панцентромерным ДНК-зондом. Оба метода дали довольно сопоставимые оценки индивидуальных доз в диапазоне от 1,1 до 5,8 Гр для 12 из 15 лиц, в то время как трое из них не показали повышенной частоты aberrаций [234]. При проведении последующих исследований изучалась частота транслокаций у тех же доноров в течение трехлетнего периода с сентября 1991 г. до июля 1994 г., и в 11 случаях из 12 она оставалась довольно постоянной. Это позволило получить сопоставимые оценки доз для проб, взятых в разное время [212].

Из этих исследований нельзя сделать прямого вывода о стабильности транслокаций, поскольку нет никаких исходных данных, полученных сразу после облучения (т.е. биологической и физической дозиметрии). Однако последующие исследования указывают, что транслокации могут остаться постоянными, начиная с пяти лет после облучения, и при различных уровнях дозы.

### **10.8.2. Ретроспективная биологическая дозиметрия для населения или групп с профессиональным облучением при наличии физических оценок дозы**

Было выполнено несколько исследований частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах, предназначенных прежде всего для оценки поглощенной дозы, например, у пострадавших при атомной бомбардировке Хиросимы и Нагасаки (Япония) или ликвидаторов чернобыльской аварии. Частота транслокаций, зарегистрированная у выживших после атомной бомбардировки, оказалась близкой к ожидаемым значениям, выведенным из оценок доз, полученных при помощи системы DS86 (Дозиметрическая система 1986), при сравнении с кривой доза-эффект *in vitro* [145]. Таким образом, эти исследования подтвердили идею о длительной персистенции транслокаций. Однако в противоположность этому, значительное различие было выявлено у четырех рабочих, облученных во время аварии на радиохимическом заводе Y-12 в Окридже (США) в 1959 году, у которых несколько лет спустя частота транслокаций была существенно ниже ожидаемых значений [170].

В 1994 г. было выполнено пилотное исследование приблизительно для 60 лиц, привлеченных в Чернобыль из Эстонии в качестве ликвидаторов в 1986-1987 гг., у которых были зарегистрированы дозы от 0 до 300 мЗв. Цель исследования состояла в том, чтобы определить, можно ли при совместном использовании анализа дицентриков и анализа транслокаций проверить дозы, зарегистрированные для этих лиц [235]. В другом комплексе исследований были изучены 52 ликвидатора методом FISH-окрашивания [236]. Оценки дицентриков были уже недействительны, но транслокации можно было использовать, чтобы проверить дозиметрию, выполненную на раннем этапе лишь для особо сильно облученных лиц. Для огромного большинства менее облученных лиц метод FISH был сочтен нецелесообразным в качестве средства индивидуальной дозиметрии. Однако он был предложен в качестве метода, имеющего некоторую ценность для различения групп лиц, облученных различными дозами [235], и это подтвердило исследование для эстонских ликвидаторов [92, 237].

Имеется еще массив данных для 75 работников предприятия Маяк, для которых имелась физическая дозиметрия, и кто получил основное облучение между 1948 году и 1963 году [238]. Сообщалось о кумулятивных внешних дозах от 0,02 до 9,91 Зв и плутониевой нагрузке от 0,26 до 18,5 кБк. Через 35-40 лет после растянутого во времени облучения, используя цельнохромосомные зонды для окрашивания хромосом 1, 4 и 12 в комбинации с панцентромерным зондом, была определена частота транслокаций. Результаты показали более высокую частоту транслокаций у работников предприятия Маяк по сравнению с подобранной контрольной группой. Однако диапазон выходов транслокаций был в общем случае ниже, чем ожидалось от зарегистрированных индивидуальных доз и калибровочных кривых [235, 238].

Для 73 облученных жителей населенных пунктов вдоль реки Теча был выполнен анализ на метафазных препаратах по методу FISH. Исследуемая группа состояла из двух подгрупп, живущих в населенных пунктах на расстоянии 7-60 км и 78-148 км вниз по течению от завода. Обе подгруппы отличались от контроля, и у них наблюдалась значительно более высокая средняя частота транслокаций [239].

Биологические дозиметрические исследования персонала, работавшего в радиационно-опасных условиях на ядерном объекте в Селлафилде с накопленными в течение жизни дозами облучения всего тела от 173 до 1108 мЗв у всех, кроме трех человек с дозой >500 мЗв, были выполнены в период 1991-1994 гг. Когда персонал был разделен на когорты в зависимости от диапазона доз, средняя частота транслокаций групп показала существенное увеличение с увеличением категориями дозы. Однако кумулятивные дозы в течение жизни не были связаны с частотой дицентриков [240].

У выживших после атомной бомбардировки Хиросимы была обнаружена хорошая корреляция между данными электронно-спиновой резонансной дозиметрии и цитогенетической дозиметрии, при использовании частоты транслокаций лимфоцитов 40 выживших лиц, которые жили вблизи эпицентра (ок. 2 км), и кому было по крайней мере 10 лет во время бомбардировки [241]. Исследования выживших после атомной бомбардировки Хиросимы указывают на постоянство стабильных транслокаций. Однако на основе других упомянутых выше исследований можно прийти к заключению, что некоторая часть транслокаций, похоже, снижается со временем после облучения.

### **10.8.3. Ретроспективная биологическая дозиметрия для лиц с известной биологической оценкой дозы, сделанной вскоре после аварий методом традиционного анализа дицентриков**

#### *Авария с тритием*

Описанное ранее аварийное переоблучение тритиевой водой (Раздел 9.7.5.7) также было исследовано ретроспективно методом FISH [242]. Первоначально анализ дицентриков показал среднюю дозу 0,38 Гр., что хорошо согласовывалось со значением 0,47 Гр, полученным при измерении трития в моче. Эти значения являются средними дозами в мягких тканях тела, поскольку тритий инкорпорируется в воду организма, распространяя более или менее равномерное облучение на все мягкие ткани. Последующие заборы крови показали ожидаемое снижение выхода дицентриков, что согласуется со временем полувыведения 3,3 года.

Спустя шесть и одиннадцать лет после аварии была предпринята дозиметрия по методу FISH с использованием комбинированных выходов однонаправленных и двунаправленных транслокаций. В первом случае одна лаборатория сделала анализ с одноцветным окрашиванием хромосом #1, #2 и #4, а для второго анализа работу поделили со второй лабораторией, которая окрасила хромосомы #2, #3 и #5. Оценки дозы выполнялись

относительно калибровки *in vitro*, сделанной для трития в одной из лабораторий, что дало линейную кривую доза-эффект для общего числа транслокации с поправкой на полный геном  $Y = C + (5.26 \pm 0.49) \times 10^{-2}D$ . Объединенные данные от подсчета всех данных FISH дали оценку дозы 0,48 Гр.

#### *Авария в Гоянии*

При радиационной аварии в Гоянии (Бразилия, 1987) с вскрытием радиотерапевтического источника  $^{137}\text{Cs}$  было облучено большое количество людей [149, 150]. Эти лица стали хорошей когортой для последующего наблюдения. Сразу после обнаружения аварии лимфоциты 129 пострадавших лиц были проанализированы на частоту дицентриков и колец. Оценка дозы двадцати девяти была в диапазоне от 0,3 до 5,9 Гр [243]. Хотя большинство этих людей получили неравномерное облучение, о чем свидетельствовало присутствие локализованных повреждений кожи, все случаи, кроме шести, показали пуассоновское распределение аберраций. Некоторые из этих пострадавших наблюдались в течение целого ряда лет путем исследования частоты дицентриков (выполнение анализов началось сразу же после аварии), а также транслокаций при помощи метода FISH (выполнение началось через пять лет после аварии) для ретроспективной радиационной дозиметрии [209].

Данные по частоте транслокаций (с использований различные коктейлей зондов, охватывающих ок. 80% генома), полученные методом FISH, можно непосредственно сравнивать с исходной базовой частотой дицентриков для тех же лиц [209]. Частота транслокаций, наблюдаемая спустя годы после радиационного облучения (начиная с 1992 г. и далее) с повышенными дозами ( $> 1$  Гр), была в два-три раза ниже, чем первоначальное число дицентриков, определенное в 1987 г. Для уровней облучения, оцененных как  $< 0,9$  Гр, были найдены небольшие различия между частотой транслокаций и начальными выходами дицентриков. Точность этих оценок дозы можно было бы повысить за счет подсчета большего числа клеток. Однако такие факторы, как персистенция лимфоцитов с транслокациями, уровни транслокаций, непропорциональные размеру хромосом, и межиндивидуальная вариабельность, снижают точность этих оценок. Никакого снижения числа односторонних и двусторонних транслокаций при последующем наблюдении пациентов обнаружено не было [209], что аналогично результатам исследований для Чернобыля. Стром и др. [244] также оценивали пострадавших при аварии в Гоянии спустя один год после их облучения, используя анализ FISH. Когда эти данные сравнили с частотой дицентриков, полученной сразу после аварии, то увидели более низкую частоту транслокаций.

#### *Аварии в Германии и Эстонии*

В отличие от вышеописанного, в другом исследовании [245], выполненном спустя 11 лет после аварии с тремя пострадавшими, задействованными на радиационно-опасной работе, метод FISH для хромосом #2, #4 и #8 и с использованием панцентромерного зонда дал устойчивую частоту транслокаций, которая незначительно отличалась от средней частоты дицентриков, определенной методом традиционного ФПГ-окрашивания вскоре после обнаружения аварии. Приблизительно 75% транслокаций были идентифицированы как транслокации двунаправленного типа. После радиационной аварии в Эстонии в 1994 г. для пяти человек были выполнены исследования хромосом через месяц и далее через 2, 6, 10, 12, 17, 22 и 24 месяца после облучения, и полученная оценка дала ок. 1-3 Гр [213, 246]. В последующих исследованиях двунаправленные транслокации оставались относительно устойчивыми у всех пяти пострадавших, а у одного человека наблюдалось существенное снижение однонаправленных транслокаций. Через 12 месяцев после облучения число дицентриков уменьшились у всех пострадавших приблизительно до 50% от первоначальной частоты [246]. Последующее исследование, охватывающее семилетний

период после аварии, указывало на то, что при подсчете числа транслокаций в стабильных клетках число транслокаций, наблюдаемых во всех клетках, похоже, не снижается. В стабильных клетках выход транслокаций в первые годы наблюдения пострадавших от времени не зависел [174].

#### *Стамбульская авария*

В Разделе 9.7.5.6 описан случай, когда несколько человек были облучены неэкранированным источником  $^{60}\text{Co}$ , смешанным с металлоломом. Власти признали факт радиационного облучения через месяц после аварии. У пациентов наблюдалось значительное уменьшение количества клеток крови. У пяти наиболее серьезно облученных лиц анализ дицентриков показал дозы от 2,2 до 3,1 Гр. Это включает корректировку G-функции относительно кривой доза-эффект, чтобы принять во внимание облучение, продолжавшееся свыше нескольких часов. В Разделе 9.7.4.4 отмечено, что когда облучение является достаточно большим, чтобы вызвать детерминированные эффекты, такие как уменьшение количества клеток крови, выходы дицентриков могут заметно снижаться в течение нескольких недель.

Для тех же проб крови, которые использовались для анализа дицентриков, была выполнена дозиметрия по методу FISH. Анализы выполнялись в трех лабораториях [158], а конечные оценки дозы были основаны на комбинированных значениях выхода однонаправленных и двунаправленных транслокаций по объединенным данным лабораторий. Оценки дозы по методу FISH, которые также включают корректировку G-функции, были на 20-30% выше значений, полученных для дицентриков.

Метод FISH обычно рассматривают как средство ретроспективной дозиметрии, где забор крови выполняют через годы после облучения, или для тех случаев, когда имело место долговременное облучение, например, от экологического загрязнения радионуклидами. Однако этот случай весьма хорошо проиллюстрировал, что метод FISH также имеет значение в случаях, когда были получены большие дозы, а забор крови был несколько задержан – в масштабе времени, где для меньших доз анализ дицентриков обычно считается вполне достаточным.

#### *Авария в Грузии*

Одиннадцать молодых пограничников получили случайное облучение от одного или нескольких источников  $^{137}\text{Cs}$ , активность которых не превышала 150 ГБк, в центре военной подготовки Лило. Источники были предназначены для обучения и для калибровки приборов. Облучение пострадавших продолжалось около одного года, с середины 1996 г. до апреля 1997 г. [247].

Четверо наиболее сильно облученных пограничников были направлены в больницу во Франции, где в ноябре 1997 г. были проведены цитогенетические исследования [248] (Таблица 13).

ТАБЛИЦА 13. ЧИСЛО НЕСТАБИЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ (В СКОБКАХ ЧАСТОТА НА КЛЕТКУ)<sup>a</sup>

| Пациент | Подсчитанные клетки | Dic       | Rc        | Ace        | u-критерий | Доза по дицентрикам     | Доза по FISH            |
|---------|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|
|         |                     |           |           |            |            | Гр [95%-ый довер. инт.] | Гр [95%-ый довер. инт.] |
| 1       | 500                 | 14 (0,03) | 0 (0,000) | 11 (0,022) | -0,43      | 0,4 [0,2–0,6]           | 0,7 [0,4–1,0]           |
| 2       | 500                 | 19 (0,04) | 1 (0,002) | 15 (0,030) | -0,59      | 0,5 [0,4–0,7]           | 0,4 [0,1–0,7]           |
| 3       | 502                 | 55 (0,11) | 4 (0,008) | 24 (0,048) | 4,68       | 1,1 [0,9–1,3]           | 0,8 [0,6–1,1]           |
| 4       | 518                 | 80 (0,15) | 4 (0,008) | 25 (0,048) | 3,61       | 1,3 [1,1–1,5]           | 1,7 [1,4–1,9]           |

<sup>a</sup> u-критерий указывает на значительную избыточную дисперсию,  $u > 1.96$ ; или пониженную дисперсию,  $u < 1.96$ . Оценки дозы получены из анализа дицентриков и двунаправленных транслокаций.

Для оценки дозы использовалась острая калибровочная кривая *in vitro* ( $0,5 \text{ Гр.мин}^{-1}$ )  $^{60}\text{Co}$  для дицентриков и колец. Для лиц #1 и #2 физическая реконструкция дозы дает основание предполагать высоко локализованное облучение, что не было подтверждено распределением дицентриков на клетку ( $u < 1,96$ , Таб. 13). Поэтому дозы, которые были вычислены, исходя из острого однородного облучения, намного ниже оценок дозы для лиц #3 и #4, где распределения аберраций показали избыточную дисперсию ( $u > 1,96$ ), что дает основание предполагать частичное облучение тела. Это согласуется с обстоятельствами облучения, как восстановлено физической дозиметрией.

Все четыре пациента, вероятно, страдали от лимфопении до прибытия во Францию, и, следовательно, усредненные оценки дозы всего тела, основанные на нестабильных аберрациях (Раздел 9.7.7.4), могут быть занижены. Поэтому был также выполнен анализ транслокаций по методу FISH, где рассматривались все клетки, а не только устойчивые. Три пары хромосом (# 2, #4 и #12) были окрашены при помощи панцентромерного зонда. Для лица #2 не было отмечено никакого различия в оценке дозы по выходу дицентриков или по выходу транслокаций (Таблица 13). Для лиц #1 и #4 значения FISH были выше, чем для дицентриков, но эти различия не были статистически значимыми. Однако для лица #3 анализ дицентриков дал более высокую оценку дозы. Эти различия можно, вероятно, объяснить неравномерностью и фракционированием облучения, которые заметно отличались от одного пациента к другому, и поэтому изменили распределение транслокаций в нестабильных клетках и, следовательно, относительное исчезновение дицентриков по сравнению с транслокациями.

Цитогенетические исследования были продолжены (Рис. 33 и 34), хотя пробы крови не всегда были доступны по каждому человеку.

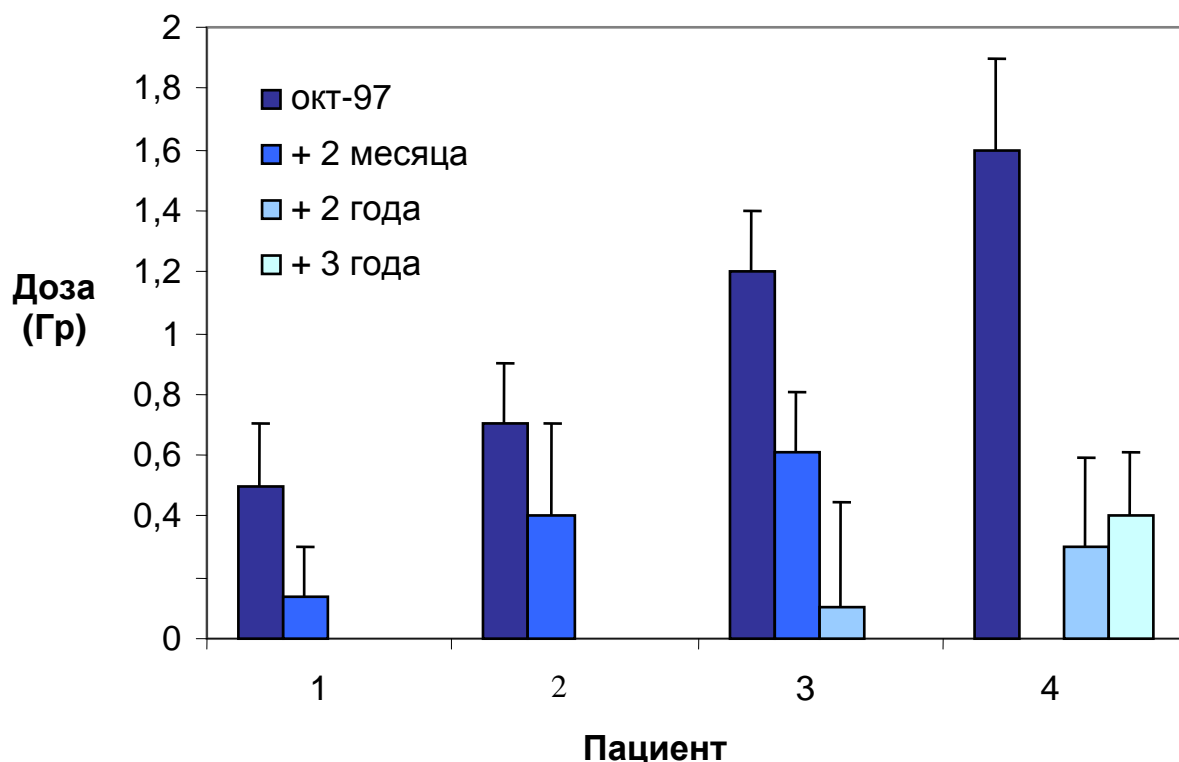
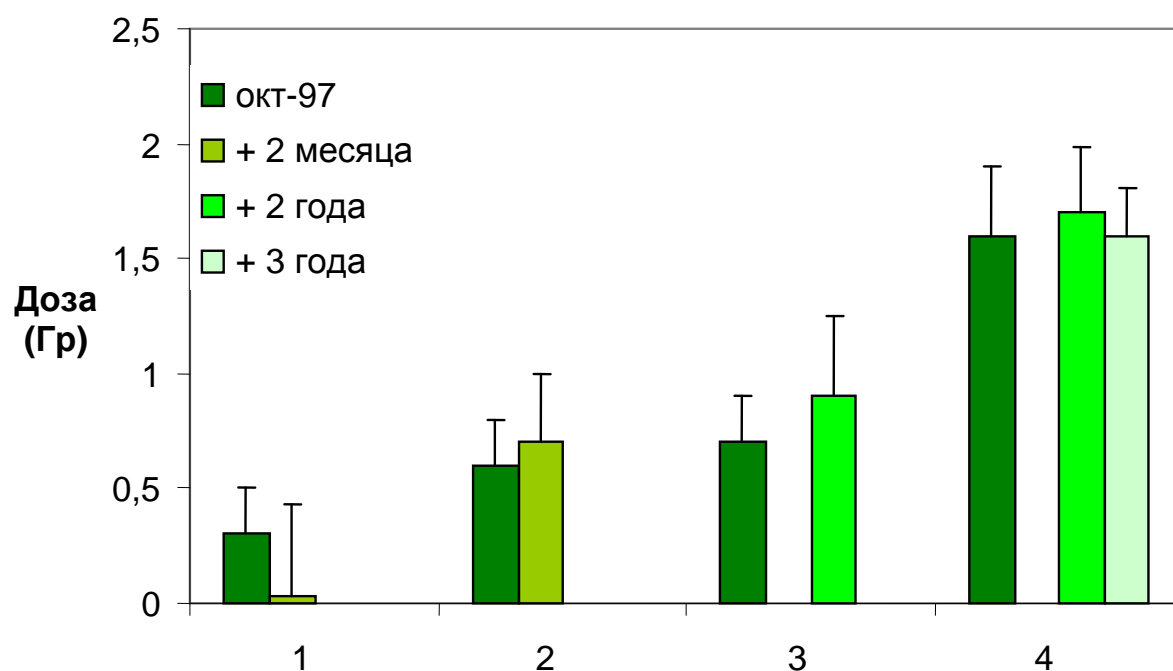


РИС. 33. Изменение оценок дозы, выведенных из дицентриков, со временем после облучения.



Как и ожидалось, снижение выхода дицентриков наблюдалось в течение длительного времени у всех пациентов. При этом у трех из этих четырех пациентов никакого снижения частоты двунаправленных транслокаций не наблюдалось. Для лица #1 частота транслокаций уменьшилась спустя два месяца после первого забора крови, но с учетом неопределенностей это снижение не является статистически значимым. Общая стабильность более поздних данных о транслокациях, вероятно, отражает быстрое обновление лимфоцитов, связанное с лимфопенией и быстрой элиминацией нестабильных aberrаций. Более поздние данные FISH, возможно, свидетельствуют о дозе, полученной стволовыми клетками костного мозга.

## 11. АНАЛИЗ МЕТОДОМ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ КОНДЕНСАЦИИ ХРОМОСОМ (РСС)

Биологическую дозиметрию обычно выполняют путем анализа дицентриков и/или транслокаций в первом митозе после бластотрансформации с ФГА *in vitro*. У этих методов имеется несколько общепризнанных проблем, а именно: радиационно-индуцированная задержка митоза и некроз клеток во время двухдневного культивирования, которые особенно сказываются после больших доз, что может вызвать значительную недооценку дозы радиационного облучения [250]. В данном разделе рассматриваются методы индуцирования преждевременной конденсации хромосом, то есть конденсации в какое-то время до первого митоза, с тем чтобы сократить или исключить время культивирования, и, следовательно, возможность задержки митоза или гибели клеток.

### 11.1. РСС ПУТЕМ МИТОТИЧЕСКОГО СЛИЯНИЯ

Индукция РСС путем слияния лимфоцитов человека с митотическими клетками яичника китайского хомячка (СНО) в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве фактора, вызывающего слияние клеток позволяет измерять хромосомные aberrации непосредственно после облучения, без необходимости какого-либо стимулирования митогенами или культивирования [66]. Использование этого метода РСС, в комбинации с традиционными методами, такими как дифференциальное С-окрашивание или FISH с хромосомно-специфическими ДНК-библиотеками и панцентромерными зондами или без них, позволяет обнаруживать разрывы, дицентрики и кольца, а также транслокации. Этот метод анализа был предложен как средство биологической дозиметрии для анализа частоты хромосомных aberrаций, т.е. избыточных разрывов, дицентриков и транслокаций [67, 72, 75, 250]. Анализ целесообразно использовать для определения облучения низкими дозами, а также после опасных для жизни высоких острых доз с низкой и высокой ЛПЭ. Кроме того, он позволяет точно различить полные и частичные облучения тела [75]. Поскольку при использовании этого анализа РСС число нормальных клеток более точно отражает долю необлученных лимфоцитов, этот метод эффективен для обнаружения даже небольшой незадействованной доли (на уровне 5%). При помощи этого анализа можно также количественно отличать небольшие локализованные ожоги от частичного облучения тела.

#### 11.1.1. Условия культивирования и слияния клеток

##### 11.1.1.1. Использование митотических клеток яичника китайского хомячка

До начала анализа РСС необходимо подготовить митотические клетки яичника китайского хомячка (СНО). Как правило, клеточные культуры СНО ставятся из исходных линий. Они легко доступны, очень легки в обращении и имеют короткий клеточный цикл ок. 12 часов. Клетки СНО можно выращивать в 750-миллилитровых культуральных флаконах или микробиологических матрасах, в полной среде (состоящей из среды F-10, 15%-ой сыворотки новорожденного теленка и антибиотиков). Митотические клетки можно получить, добавляя колцемид (с конечной концентрацией 0,1 мкг/мл) на срок 4-6 часов, когда культуры наполовину полны, и сопровождая это стряхиванием митотических клеток. Митотические клетки из одного флакона или матраса можно отбирать несколько раз в день; поэтому после каждого отбора необходимо возмещать культуральную среду с колцемидом во флаконах, содержащих остающиеся клетки. Митотические клетки могут быть приготовлены в больших количествах заранее и до использования храниться в морозильнике при температуре от -80°C до -110°C.

#### *11.1.1.2. Отбор лимфоцитов*

В общем случае для отбора лимфоцитов следует использовать метод Ficoll Нураque, как описано ранее в Разделе 9.1.5.2. Его преимущество состоит в том, что после отбора достаточного количества лимфоцитов часть их можно использовать немедленно, а остальные хранить в замороженном виде при температуре от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$  для будущего использования, если потребуется.

#### *11.1.1.3. Фактор, вызывающий слияние клеток*

В общем случае следует использовать полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярным весом 1450, а концентрация, требуемая для слияния, составляет 40-50% по массе/объему (в среде F-10 без сыворотки, PBS, или, предпочтительно, в среде RPMI-1640 с буфером HEPES без сыворотки).

#### *11.1.1.4. Процессы слияния и конденсации хромосом*

Для индуцирования преждевременной конденсации хромосом необходимо слияние лимфоцитов с митотическими клетками яичника китайского хомячка (СНО) (в отношении 5:1), которые в присутствии полиэтиленгликоля обладают фактором стимуляции митоза. Процесс слияния занимает лишь 4 минуты (1 минута в одном лишь полиэтиленгликоле, затем постепенно должна добавляться среда F-10). Далее следует одночасовая инкубация в полной среде с колцемидом при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  [67, 72, 251].

#### *11.1.1.5. Процедуры фиксации*

В принципе, процедура фиксации подобна методике, используемой для метафаз (Раздел 9.2), но немного изменяются оптимальные временные параметры и концентрации. Лимфоциты обрабатываются гипотоническим раствором KCl (0,075M) и выдерживаются в предварительно нагретой водяной бане (при  $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 3-4 минут, и после центрифугирования клетки можно фиксировать в смеси уксусной кислоты и метанола (1:3).

Для подготовки предметных стекол используется стандартная методика, как описано ранее для других анализов (см. Раздел 9.2).

#### *11.1.1.6. Процедуры окрашивания*

Выбор метода окрашивания зависит от биологической конечной точки, подлежащей анализу:

##### **1) Стандартный анализ разрывов хромосом**

При проведении анализа хромосомных aberrаций в форме радиационно-индуцированных разрывов хромосомы для препаратов может быть выполнено традиционное окрашивание красителем Гимза (Gurr R66) или ФПГ-окрашивание (флюоресценция плюс окрашивание красителем Гимза), как было описано в Разделе 9.3.2 (Рис. 35) [67, 252]. Протокол с использованием ФПГ был разработан для РСС с клетками, где два слитых хромосомных компонента полностью перемешаны. Для описанного здесь метода работы с лимфоцитами в этом, вероятно, нет необходимости, поскольку два набора хромосом часто остаются в двух группах, как показано в Рис. 35, где однокиточные хромосомы человека ясно различимы. Недостаток ФПГ-окрашивания состоит в том, что хромосомы часто разбухают, и это может не позволить точно подсчитать фрагменты РСС, поскольку небольшие смежные разбухшие объекты могут касаться друг друга и производить впечатление единой структуры.

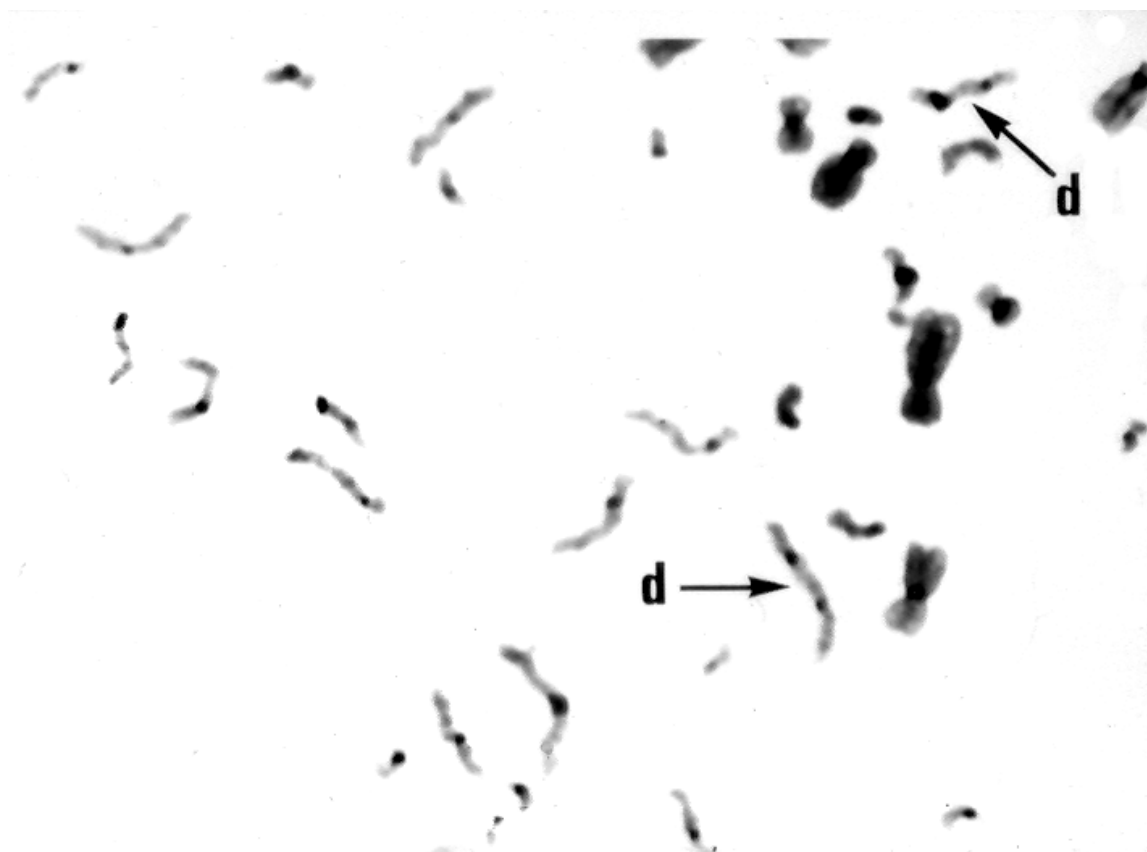




*РИС. 35. РСС в фазе  $G_0$  с некоторыми фрагментами, полученными методом митотического слияния (отмечены стрелками)*

2) Анализ дицентриков с использованием дифференциального С-окрашивания.

Кроме разрывов хромосом, можно также визуализировать дицентрики. Для этого препараты должны быть предварительно обработаны гидроокисью бария и соевым раствором, (Раздел 9.3.3), с последующим окрашиванием красителем Гимза, благодаря которому центромерная область всех хромосом выделяется таким образом, чтобы можно было легко отличить дицентрические хромосомы от моноцентрических (Рис. 36) [70, 79].



*РИС. 36. РСС с дифференциальным С-окрашиванием, показывающее два дицентрика (d)*

- 3) Анализ транслокаций и дицентриков с использованием зондов окрашивания хромосом

Частоту радиационно-индуцированных транслокаций и дицентриков можно также определять на препаратах РСС методом FISH, используя либо зонды окрашивания хромосом сами по себе, либо их комбинацию с панцентромерным зондом (Рис. 37). Последний вариант дает более точную дискриминацию между транслокациями и дицентриками [72].

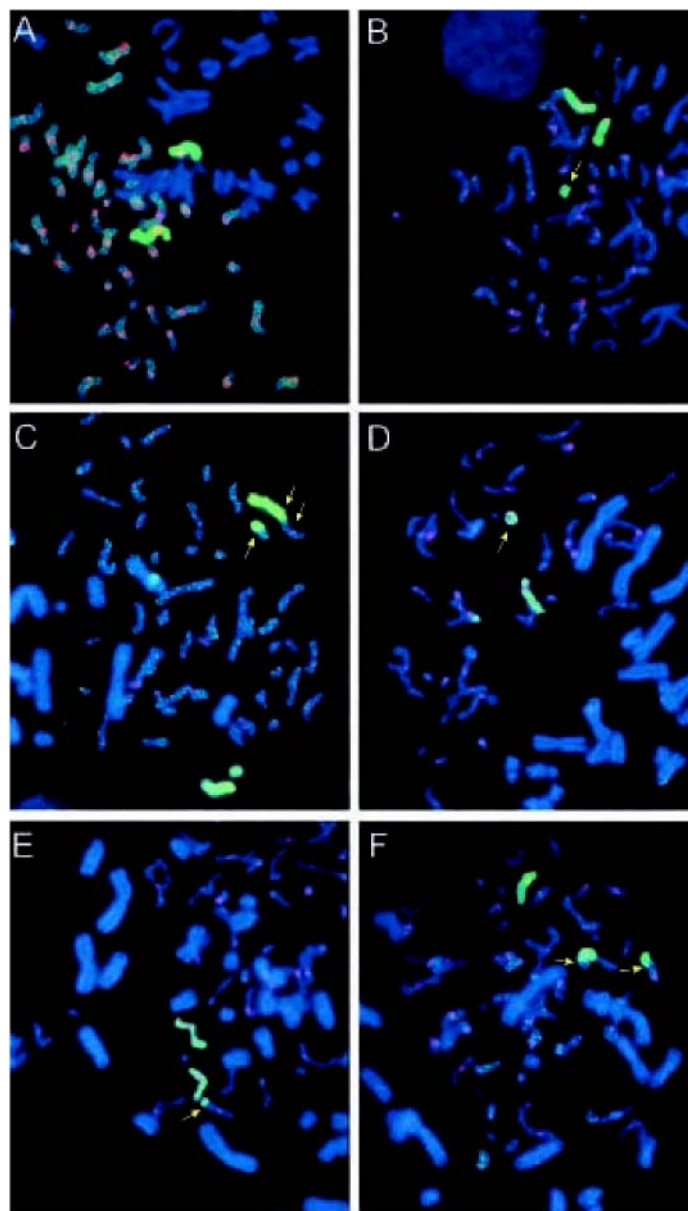


РИС. 37. РСС с двуцветной FISH, комбинацией хромосомного красителя (#8) и панцентромерного зонда для целого генома. В необлученном контроле (А) нормальное РСС. В облученных клетках стрелки указывают на (В) избыточный разрыв в РСС, *ace(b)*; (С) дицентрик, *dic(BA)*, двуцветный фрагмент, *ace(ba)*; (D) кольцо, *r(B)*; (E), (F) терминальная транслокация, *t(BA)* и *t(AB)* [8].

#### 11.1.2. Анализ

Критерии анализа препаратов частично аналогичны тем, что описаны в Разделе 9.4 (т.е. кодирование стекол, параметры сканирования и т.д.). Препараты РСС можно наносить вручную или при помощи автоматизированных систем поиска метафазы, имеющих более общее использование (Раздел 13.3) [75]. Рекомендуется облегчить подсчет при помощи системы регистрации, позволяющей отмечать каждую часть хромосомы на рисунке или изображении препарата РСС. Можно использовать насадку для микроскопа (камера-люцида) для визуализации препарата РСС в намного большем масштабе и регистрировать отметки на рисунке. Некоторые системы поиска метафаз снабжены специализированными приложениями, которые позволяют выполнять аннотацию оцифрованных изображений. Координаты предметного столика микроскопа с препаратом РСС на стеклах должны быть зарегистрированы, а метод выбора кандидатного препарата РСС для подсчета не должен вносить какое-либо искажение в выходы аберраций.

Анализ включает подсчет числа элементов хромосом, которые выглядят как одиночные хроматиды и которые можно легко отличить от митотических хромосом СНО в интерфазных препаратах РСС человека после окрашивания красителем Гимза. При использовании метода ФПГ хромосомы человека выглядят окрашенными в темный цвет, в то время как клетки СНО, прошедшие больше двух клеточных циклов в среде с добавлением 5-БДУ, показывают «эффект арлекина» и выглядят лишь слегка окрашенными (см. Рис. 22). Для анализа FISH можно использовать ДНК хомячка cot-1 для маскирования всех сигналов в хромосомах СНО, с тем чтобы были выделены лишь соответствующие РСС человека (Рис. 37).

### 11.1.3. Критерии подсчета

Микроскопическую картину РСС можно использовать для того, чтобы легко определить положение лимфоцитов в клеточном цикле на момент их обработки. Клетки, которые были в фазе G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>, выглядят как одна хроматида, пульверизованные хромосомы и наличие двух хроматид, соответственно. При биологической дозиметрии препаратов, окрашенных красителем Гимза, подсчет производят только в препаратах, включающие одну хроматиду, то есть лимфоциты человека, обработанные в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, и каждый элемент представляет одну хромосому человека (Рис. 35).

Поэтому в необлученных лимфоцитах будут подсчитаны 46 элементов. Число хромосомных элементов в облученных пробах крови регистрируется, а частота индуцирования оценивается просто вычитанием значения, полученного в необработанных пробах. Для случаев подозреваемого частичного облучения тела был внедрен альтернативный аналитический метод Q<sub>рсс</sub>, который включает анализ выхода избыточных фрагментов РСС в поврежденных клетках (содержащих избыточные фрагменты РСС) [75]. По своей концепции этот метод идентичен методу Q<sub>др</sub>, введенному Сасаки и Мията [142] (см. Раздел 9.7.4.3). После дифференциального С-окрашивания или использования панцентромерных зондов и хромосомно-специфических ДНК-библиотек с методом FISH, присутствие дицентриков и/или транслокаций на стеклах может быть подсчитано (см. Рис. 37), зарегистрировано и проанализировано, как описано в Разделах 9.4 и 10.4.

## 11.2. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ РСС

### 11.2.1. Экспресс-анализ интерфазных хромосом (RICA)

При этом анализе также отпадает необходимость длительного культивирования. Лимфоциты, выделенные из крови методом Ficoll Нураке (Раздел 9.1.5.2), помещаются в культуральную среду, содержащую ингибитор фосфатазы, такой как оадаиковая кислота или каликулин-А, аденозинтрифосфат и p34<sup>cdc2</sup>/циклин В киназу, и инкубируются при температуре 37°C в течение всего лишь 3 часов. Полный протокол описан Прасанна и др. [76]. Фиксация и подготовка препаратов (гипотонический раствор хлорида калия; смесь метанола и уксусной кислоты (3:1); накапывание на очищенные стекла) выполняются после обычных процедур, используемых для метафаз.

Далее после гибридизации *in situ* и окрашивания хромосом радиационно-индуцированные повреждения анализируются при помощи флюоресцентной микроскопии (Рис. 38).

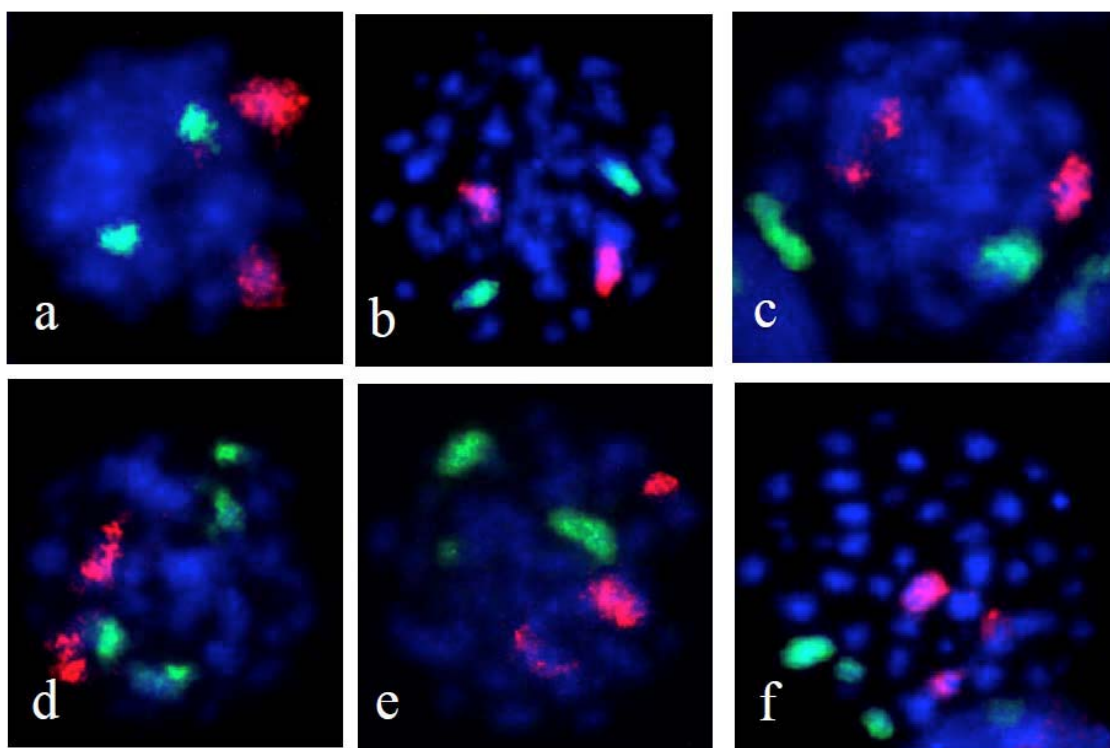


РИС. 38. Микрофотоснимки, показывающие FISH-окрашенную хромосому человека #1 (красный) и #2 (зеленый) в интерфазных лимфоцитах, облученных гамма-излучением  $^{60}\text{Co}$  и визуализированных при помощи анализа RICA [78]. Нормальная клетка с двумя красными и двумя зелеными пятнами (a и b), aberrантная хромосома #1 с более чем двумя красными пятнами (c), aberrантная хромосома #2 с более чем двумя зелеными пятнами (d), клетки с более чем двумя зелеными и красными пятнами (e и f) (фото с разрешения Pathak и Prasanna, AFRRI, США).

Нормальные клетки показывают два флуоресцентных пятна на хромосому, тогда как клетки со структурными aberrациями (разрывы и обмены), относящиеся к определенной хромосоме (хромосомам), соответствующей зонду (зондам) окрашивания, могут показывать больше двух пятен. Для биологической дозиметрии достаточно использовать один большой хромосомный зонд [76]. Однако чувствительность анализа повышается при использовании более чем одного хромосомного зонда [78].

#### 11.2.2. Анализ колец методом РСС

Среди методов химически-индуцированного РСС для биологической дозиметрии одной из простых и практичных процедур является подсчет колец в хромосомах, окрашенных красителем Гимза. Для этого анализа все-таки требуется культивирование лимфоцитов, и в соответствии с методикой, описанной Канда и др. [68], рекомендуется культивирование в течение 48 часов. Следовательно, здесь нет экономии времени, но анализ колец методом РСС особенно целесообразен для случаев высокого переоблучения в диапазоне доз, где кривая доза-эффект для традиционного анализа дицентриков показывает признаки насыщения. Она была калибрована и использовалась для доз, эквивалентных ок. 20 Гр рентгеновского излучения. При такой дозе число индуцированных дицентриков и фрагментов слишком велико для достоверного подсчета. Однако в лимфоцитах кольца индуцируются намного реже, часто ~10% от числа дицентриков, вследствие чего подсчет колец становится выполнимой конечной точкой после очень высокой дозы.

#### *11.2.2.1. Культивирование клеток, химическая обработка и подготовка препаратов*

Это описано в пошаговом подробном протоколе в Приложении III.

##### *Подготовка реагентов*

Необходимо подготовить ингибиторы фосфорилирования ДНК, такие как окадаиновая кислота или каликулин-А. Эти химические соединения являются канцерогенами, поэтому при обращении с ними необходимо соблюдать соответствующие меры безопасности. Каликулин-А приблизительно в 20 раз эффективнее в отношении индуцирования РСС, чем окадаиновая кислота, хотя их механизмы индукции РСС, вероятно, схожи, если судить по зависимости от дозы и получающейся морфологии хромосомы. Окадаиновую кислоту или каликулин-А растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО), разбавляют средой и хранят при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в виде первичного раствора (например, 5-10 мкМ).

##### *Культивирование*

Для химического индуцирования РСС в лимфоцитах обычно требуется, чтобы клетки находились в состоянии деления. Поэтому клетки проходят ФГА-стимуляцию и культивирование в течение 48 часов по методике, аналогичной той, что описана в Разделе 9.1 для получения метафаз. Хотя РСС можно индуцировать в культурах цельной крови, использование выделенных лимфоцитов позволяет получить более чистые препараты с большим количеством клеток (описано в Разделе 9.1.5.2). Таким образом, весьма рекомендуется выделение лимфоцитов, особенно в случае облучения с очень высокой дозой.

Стандартный протокол для индуцирования РСС включает добавление окадаиновой кислоты (500 нМ) или каликулина-А (20-50 нМ) в культуры в течение последнего часа, в результате чего получается смесь клеток РСС на всех стадиях первого клеточного цикла. Однако эффективность вводимых химических соединений может зависеть от условия культивирования и качества препарата. Концентрацию и длительность оптимальной обработки определяют на основании частоты возникновения клеток, показывающих РСС, и качества морфологии хромосом в каждой лаборатории. При недостаточной обработке возникает нехватка клеток, пригодных для анализа, тогда как чрезмерная обработка приводит к нечетким и чрезмерно конденсированным хромосомам. Процедуры фиксации, подготовки препаратов и окрашивания красителем Гимза аналогичны методикам, используемым для метафаз.

#### *11.2.2.2. Критерии подсчета*

Через 48 часов культивирования высоко облученных лимфоцитов большинство клеток, пригодных для анализа, находятся между завершением фазы  $G_2$  и метафазой. В случае облучения с низкой дозой может быть загрязнение клетками в анафазе. По сравнению с внешним видом кольцевых хромосом в метафазных пластинках (Рис. 11), РСС-кольца в завершении фазы  $G_2$  и клетки в анафазе (Рис. 39А) являются узкими, что облегчает их идентификацию. Поэтому именно эти клетки предпочтительны для подсчета РСС-колец. Клетки в завершении фазы  $G_2$  и клетки в анафазе можно различать по прикреплению или отделению сестринских хроматид, соответственно (Рис. 39В).

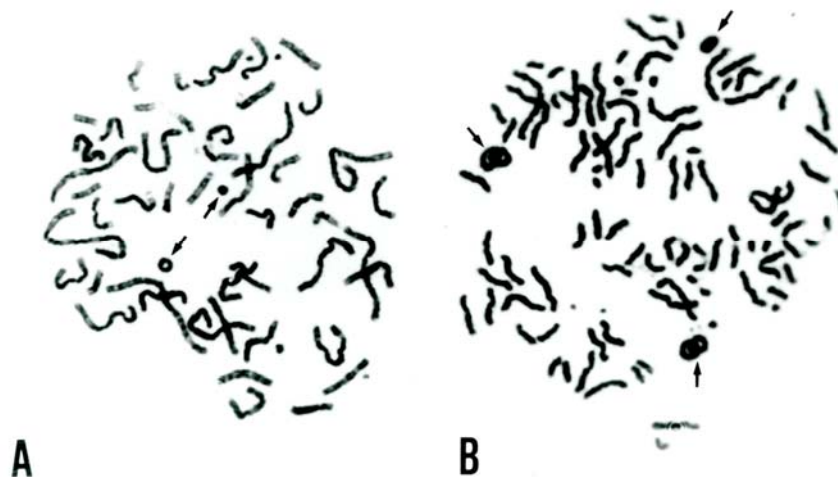


РИС. 39. Примеры индуцирования РСС облученных лимфоцитов ооадаиковой кислотой на различных фазах клеточного цикла. (А) G<sub>2</sub>/М – РСС-клетки, (В) М/А – РСС-клетка, показывающая отделенные сестринские хроматиды. Стрелки указывают на кольцевые хромосомы [68].

Частота РСС-колец отличается между клетками в завершении фазы G<sub>2</sub> и клетками анафазы незначительно, и эти данные могут быть объединены.

Хромосома круглой формы подсчитывается как РСС-кольцо. В РСС-клетках с окрашиванием лишь красителем Гимза центромеры не дают четкой визуализации, поэтому РСС-кольца не классифицируются как центрические или ацентрические формы.

Как и в случае дицентриков (Раздел 9.7.4.3), анализ межклеточного распределения РСС-колец относительно распределения Пуассона предоставляет некоторую информацию касательно равномерности облучения излучением с низкой ЛПЭ или качества излучения во время аварии. В таких ситуациях, например, где была задержка в обнаружении облучения, т.е. имеется промежуток времени между облучением и забором крови, должна иметься возможность использовать вычисление полувыведения для корректировки наблюдаемого выхода, чтобы получить оценку исходной частоты РСС-колец. В настоящее время имеется мало достоверных данных для обоснования вышесказанного. Однако последующее цитогенетическое исследование одного человека, выжившего после аварии в Токай-мура, дало период полувыведения приблизительно 8,7 месяца [253].

### 11.3. РАДИЦИОННАЯ АВАРИЯ, ИССЛЕДОВАННАЯ МЕТОДОМ РСС-КОЛЕЦ

Вскоре после публикации метода РСС-колец с калибровкой *in vitro* по рентгеновскому излучению энергией 200 кВ [68] появилась возможность исследования серьезной радиационной аварии, используя метод индуцирования РСС ооадаиковой кислотой. Была выполнена биологическая дозиметрия для трех лиц, серьезно облученных при аварии с возникновением критичности в Токай-мура (Япония) в 1999 г. [254].

Частота РСС-колец на 100 клеток в пробах крови, полученных через 9 часов после аварии, составила 150, 77 и 24, что, соответственно, дало оценки дозы >20, 7,4 (95% доверительный интервал 6,5–8,2) и 2,3 (1,8–2,8) Гр-экв. Необходимо принять во внимание, что это было комбинированное облучение гамма- и нейтронным излучением, и эквивалентная доза, измеренная в зивертах (Раздел 2), не годится для использования при таких высоких дозах, поскольку основана на оценочных рисках стохастических эффектов при низких дозах. ОБЭ-взвешенная доза в органах была специально определена для того, чтобы охарактеризовать облучение с большой дозой как произведение поглощенной дозы органа и ОБЭ, с тем чтобы оценить начало детерминированных эффектов на здоровье

[15]. ОБЭ рентгеновского излучения энергией 200 кВ было задано равным 1. Единица ОБЭ-взвешенной дозы равна Дж/кг, и в работе [15] она названа грей-эквивалент (Гр-экв). Для наиболее сильно облученного человека дозу можно аппроксимировать лишь приблизительно до >20 Гр-экв, поскольку опубликованная калибровка *in vitro* [68], показала выравнивание (насыщение) линейно-квадратичной кривой доза-эффект для ОБЭ-взвешенной дозы всего тела, приближающееся к 20 Гр-экв рентгеновского излучения энергией 200 кВ (или 20 Гр поглощенной дозы всего тела, поскольку ОБЭ равно 1).

Параллельно были также выполнены исследования проб крови путем традиционного подсчета дицентриков и колец (dic+gc) в метафазах. Поскольку доза облучения была столь высокой, количество периферических лимфоцитов быстро упало, и для культивирования клеток был выбран метод, позволяющий максимизировать вероятность получения метафаз [123]. При использовании этого метода лимфоциты концентрируют с помощью колонки Ficoll Нураque, аналогично описанию в Разделе 9.1.5.2. Для наиболее сильно облученного пациента выход составил 715 дицентриков и 188 центрических + ацентрических колец в 78 клетках, где была повреждена каждая метафаза. Соответствующие выходы для других двух человек составили 479 дицентриков и 55 колец в 175 клетках и 191 дицентриков + колец в 300 клетках. В Таблице 14, взятой из [255], приводятся оценки доз, полученные цитогенетическими методами, и также физическими измерениями с использованием активационного анализа натрия.

ТАБЛИЦА 14. СРАВНЕНИЕ ДОЗ, ПОЛУЧЕННЫХ ПО ОЦЕНКЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

| Пациент | Оценка ОБЭ-взвешенной дозы всего тела (Гр-экв) <sup>a</sup> |      |               |                               |
|---------|---|------|---------------|-------------------------------|
|         | РСС-кольца  | Dic  | Dic+R/Rc      | <sup>24</sup> Na <sup>b</sup> |
| A       | > 20  | 22,6 | 24,5          | 17–24                         |
| B       | 7,4 (6,5–8,2)   | 8,3  | 8,3           | 8,7–13                        |
| C       | 2,3 (1,8–2,8)   | -    | 3,0 (2,8–3,2) | 2,5–3,6                       |

<sup>a</sup> ОБЭ задано равным 1 для рентгеновского излучения (пациенты A и B) или гамма-излучения (пациент C).

<sup>b</sup> Ишигурэ и др. [255], где оценка ОБЭ нейтронного излучения составляет 1,5–2,0.



## 12. МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (CBMN)

### 12.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Ионизирующее излучение вызывает образование ацентрических фрагментов хромосом и в небольшой степени аномальную сегрегацию целых хромосом. Ацентрические фрагменты хромосомы и целые хромосомы, которые неспособны взаимодействовать с веретеном, отстают в анафазе, и в результате не включаются в главные дочерние ядра. Отстающий фрагмент хромосомы или целая хромосома формируются в небольшое отдельное ядро; отсюда термин «микроядро».

Микроядерный тест лимфоцитов периферической крови, основанный на экспрессии микроядер при кратковременном культивировании лимфоцитов, был впервые описан Кантрименом и Хеддлом [82]. Однако в своем первоначальном методе они не делали никаких попыток определить, действительно ли подсчитанные клетки закончили деление ядра *in vitro*, и это делало метод ненадежным, поскольку повреждение хромосомы в клетках может экспрессироваться в виде микроядер лишь при делении клеток. В конечном счете был разработан более надежный подход, основанный на использовании ингибитора цитокинеза цитохалазина-В. Используя цитохалазин-В, Фенех и Морли [83, 84] в 1985 г. смогли продемонстрировать, что клетки, которые закончили одно деление ядра, могут накапливаться и распознаваться как двухъядерные клетки. Тогда микроядра можно специфически и эффективно подсчитывать в этих двухъядерных клетках, исключая при этом неделящиеся одноядерные клетки, которые были неспособны экспрессировать микроядра *in vitro* (Рис. 19). Следовательно, результаты, полученные при помощи микроядерного теста, не искажены межиндивидуальной и межэкспериментальной вариабельностью частоты делящихся клеток, которая, как было показано, имеет сильное воздействие на наблюдаемую частоту микроядер [84, 256, 258]. Полученный микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN) с тех пор стал стандартным методом измерения микроядер в культивированных лимфоцитах.

Лимфоциты, полученные в пробе крови, сами являются результатом деления клеток *in vivo*. Поэтому можно было бы ожидать, что некоторые из них уже могут содержать микроядра. Таким образом, было показано, что подсчет микроядер в одноядерных лимфоцитах обычных мазков крови может быть особенно полезен для мониторинга генетических повреждений у групп населения с хроническим облучением [259–263]. Кроме того, подсчет микроядер в одноядерных клетках можно также использовать как интересный дополнительный параметр CBMN-теста [262, 263].

В 1990-ые годы был разработан CBMN-центромерный тест, в котором используется метод FISH и панцентромерный зонд для визуализации центромер. Этот метод позволяет различать микроядра, содержащие ацентрические фрагменты, и целые хромосомы [69, 85, 263–267]. Применяя этот метод, можно существенно увеличить чувствительность CBMN теста в диапазоне низких доз [85, 266, 267] (см. Раздел 12.4.2).

Недавно была разработана и валидирована более комплексная версия CBMN, известная как микроядерный цитомный тест с блокированием цитокинеза (CBMN-Cyt) [86], использование которой позволяет подсчитывать не только микроядра в двухъядерных и одноядерных клетках, но также нуклеоплазматические мосты (Рис. 19С) и ядерные почки в двухъядерных клетках, которые являются биомаркерами дицентрических хромосом [89] и амплификации генов [86], соответственно. Кроме того, при помощи CBMN-Cyt подсчитывают соотношение одноядерных, двухъядерных и многоядерных клеток, а также некротических и апоптотных клеток, которые являются показателями пролиферации клеток и гибели клеток, что может также повышать информативность биологической дозиметрии [88, 268].

Можно также подсчитывать микроядра в эритроцитах в качестве биомаркера повреждения хромосом, но при этом необходимо отметить, что у метода есть верхний предел обнаружения, равный 1 Гр, и забор проб крови необходимо выполнять максимально быстро после облучения из-за ингибирования эритропоэза. Недавно проточно-цитометрический микроядерный тест незрелых эритроцитов мыши *in vivo* был адаптирован для использования у людей, благодаря тому, что при подсчете микроядер ограничиваются переходными рецептор-положительными ретикулоцитами (Tf-Ret; CD71) [269]. Оценка анализа ретикулоцитов у пациентов, прошедших радиойодную терапию по поводу рака щитовидной железы, показывает, что метод может быть полезным для мониторинга людей после подозреваемого случайного радиационного облучения [270, 271].

## 12.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ CBMN-ТЕСТА

Метод культивирования лимфоцитов аналогичен описанному в Разделе 9.1 для получения метафаз. Однако основные отличия состоят в том, что (i) Cyt-B добавляется в культуры через 24 или 44 часа (24 часа предпочтительно для радиационно-биологической дозиметрии, чтобы гарантированно захватить лишь клетки первого деления), (ii) 5-бромдезоксимуридин и колcemид не используются, (iii) время культивирования продлено до 72 часов, а гипотоническая обработка, фиксация и центрифугирование модифицированы таким образом, чтобы сохранить цитоплазму клетки для легкой идентификации двухъядерных клеток. Препараты либо традиционно окрашиваются красителем Гимза для световой микроскопии, либо окрашиваются флуоресцентным красителем, таким как акридин оранж, для флуоресцентной микроскопии. Препараты можно далее обработать для выделения центромер при помощи метода FISH и панцентромерного FISH-зонда. Подробные протоколы приводятся в Приложении IV.

## 12.3. КРИТЕРИИ ПОДСЧЕТА CBMN-ТЕСТА

Подробные критерии подсчета для всех биомаркеров анализа CBMN-Cyt были опубликованы [86]. В настоящем разделе рассматриваются лишь критерии подсчета для микроядер и нуклеоплазматических мостов в двухъядерных клетках, поскольку они являются лучшими валидированными биомаркерами для биологической дозиметрии облучения ионизирующим излучением.

### 12.3.1. Критерии выбора двухъядерных клеток для подсчета частоты микроядер

Клетки с блокированием цитокинеза, в которых можно подсчитать частоту микроядер, должны иметь следующие характеристики (Рис. 19):

- a) Клетки должны быть двухъядерными.
- b) Два ядра в двухъядерной клетке должны иметь неповрежденные ядерные оболочки и должны находиться в одной и той же цитоплазме.
- c) Два ядра в двухъядерной клетке должны быть приблизительно равными по размеру, рисунку окрашивания и интенсивности окрашивания.
- d) Два ядра внутри двухъядерной клетки могут быть не связаны или могут быть прикреплены одним или несколькими тонкими нуклеоплазматическими мостами, ширина которых составляет не больше 1/4 диаметра ядра.
- e) Два основных ядра в двухъядерной клетке могут прикасаться друг к другу, но идеально не должны накладываться друг на друга. Клетка с двумя накладываются ядрами может быть подсчитана лишь в том случае, если границы любого из ядер различимы.

- f) Граница цитоплазмы или оболочка двухъядерной клетки должны быть не повреждены и четко отличимы от границ цитоплазмы смежных клеток.

### 12.3.2. Критерии подсчета микроядер

Микроядра морфологически идентичны ядрам, но меньше их по размеру (Рис. 19). У них также имеются следующие характеристики:

- Диаметр микроядер в лимфоцитах человека обычно лежит в диапазоне от  $1/16$  до  $1/3$  среднего диаметра ядер, что соответствует  $1/256$  и  $1/9$  площади одного из ядер в двухъядерных клетках, соответственно.
- Микроядра не обладают свойствами преломления света, поэтому их можно легко отличить от артефактов, таких как окрашивающие частицы.
- Микроядра не связаны и не соединены с ядрами.
- Микроядра могут касаться ядер, но не могут на них накладываться, и граница микроядра должна быть отличима от границы ядра.
- Интенсивность окрашивания микроядер и ядер обычно одинаковая, но иногда окрашивание микроядер может быть более интенсивным.

Таблица 15 иллюстрирует структуру простого бланка для регистрации микроядер.

ТАБЛИЦА 15. БЛАНК РЕЗУЛЬТАТОВ ПОДСЧЕТА МИКРОЯДЕР ДЛЯ ДВУХ КУЛЬТУР (1 И 2) ОТ ОДНОЙ ПРОБЫ КРОВИ

Проба №:

Подсчет выполнил:

Дата:

| Стекло<br>№ | Распределение микроядер (МЯ) в двухъядерных клетках |      |      |      |      |      |        | Итого<br>двухъяд.<br>клеток | Итого<br>микроядер |
|-------------|---|------|------|------|------|------|--------|-----------------------------|--------------------|
|             | 0 МЯ  | 1 МЯ | 2 МЯ | 3 МЯ | 4 МЯ | 5 МЯ | > 5 МЯ |                             |                    |
| 1           |   |      |      |      |      |      |        | 500                         |                    |
| 2           |   |      |      |      |      |      |        | 500                         |                    |
| 1 + 2       |   |      |      |      |      |      |        | 1000                        |                    |
| Примечания: |   |      |      |      |      |      |        |                             |                    |

### 12.3.3. Критерии подсчета нуклеоплазматических мостов

Нуклеоплазматический мост является непрерывной ДНК-содержащей структурой, связывающей ядра в двухъядерной клетке. Нуклеоплазматические мосты происходят от дицентрических хромосом (формируются после неправильной репарации разрывов ДНК или слияния концов теломер), в которых центромеры вытянулись к противоположным полюсам во время анафазы (Рис. 19А и 19С). У них имеются следующие характеристики:

- Ширина нуклеоплазматического моста может варьироваться в значительных пределах, но обычно не превышает  $1/4$  диаметра ядер в клетке.
- Нуклеоплазматический мост должен иметь такие же свойства окрашивания, что и

ядра.

- с) В редких случаях может наблюдаться больше одного нуклеоплазматического моста в одной двухъядерной клетке.
- д) Двухъядерная клетка с нуклеоплазматическим мостом может содержать одно или более микроядер.
- е) Могут также наблюдаться двухъядерные клетки с одним или более нуклеоплазматическим мостом и без микроядер.

Таблица 16 иллюстрирует структуру простого бланка для регистрации нуклеоплазматических мостов.

**ТАБЛИЦА 16. БЛАНК РЕЗУЛЬТАТОВ ПОДСЧЕТА НУКЛЕОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МОСТОВ ДЛЯ ДВУХ КУЛЬТУР (1 И 2) ОТ ОДНОЙ ПРОБЫ КРОВИ**

Проба №:

Подсчет выполнил:

Дата:

| Номер<br>стекла | Распределение нуклеоплазматических мостов (НПМ) в<br>двухъядерных клетках |          |          |          |          |          |            | Всего<br>двухъ-<br>ядерных<br>клеток | Всего<br>НПМ |
|-----------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|------------|--------------------------------------|--------------|
|                 | 0<br>НПМ  | 1<br>НПМ | 2<br>НПМ | 3<br>НПМ | 4<br>НПМ | 5<br>НПМ | > 5<br>НПМ |                                      |              |
| 1               |   |          |          |          |          |          |            | 500                                  |              |
| 2               |   |          |          |          |          |          |            | 500                                  |              |
| 1 + 2           |   |          |          |          |          |          |            | 1000                                 |              |
| Примечания:     |   |          |          |          |          |          |            |                                      |              |

Подсчет нуклеоплазматических мостов в тех двухъядерных клетках, где ядра касаются друг друга, может оказаться более трудным, и поэтому целесообразно указать, были ли нуклеоплазматические мосты подсчитаны во всех двухъядерных клетках, независимо от близости ядер в двухъядерной клетке, или они были подсчитаны отдельно в двухъядерных клетках, где ядра четко отделены друг от друга, и в двухъядерных клетках, где ядра соприкасаются. Однако фактических данных для того, чтобы рекомендовать подсчет нуклеоплазматических мостов только в двухъядерных клетках с несоприкасающимися ядрами, пока недостаточно.

## 12.4. ОБРАБОТКА ДАННЫХ СВМН-ТЕСТА

### 12.4.1. Доза-эффект

Калибровочные кривые доза-эффект *in vitro* получают, используя те же процедуры, что были ранее описаны в Разделе 8. Многие исследования показали, что число радиационно-индуцированных микроядер сильно коррелирует с дозой и качеством излучения [87, 272–275]. Однако поскольку имеются межлабораторные различия в дозе-эффекте микроядер вследствие использования различных протоколов, разных критериев подсчета и т.д., как и для других анализов, описанных в настоящей публикации, то любая лаборатория, намеревающаяся выполнять биологическую дозиметрию, должна построить

свои собственные калибровочные кривые доза-эффект *in vitro*. Идеально, необходимо использовать по крайней мере 8 доз в диапазоне до 5 Гр. Подбор кривых по линейной (высокая ЛПЭ) и линейно-квадратичной (низкая ЛПЭ) модели выполняется в соответствии с процедурами, описанными в Разделе 8. Типичный пример кривой доза-эффект микроядер для излучения с низкой ЛПЭ (гамма-излучение  $^{60}\text{Co}$ , мощность дозы 0,5 Гр/мин) показан на Рис. 40.

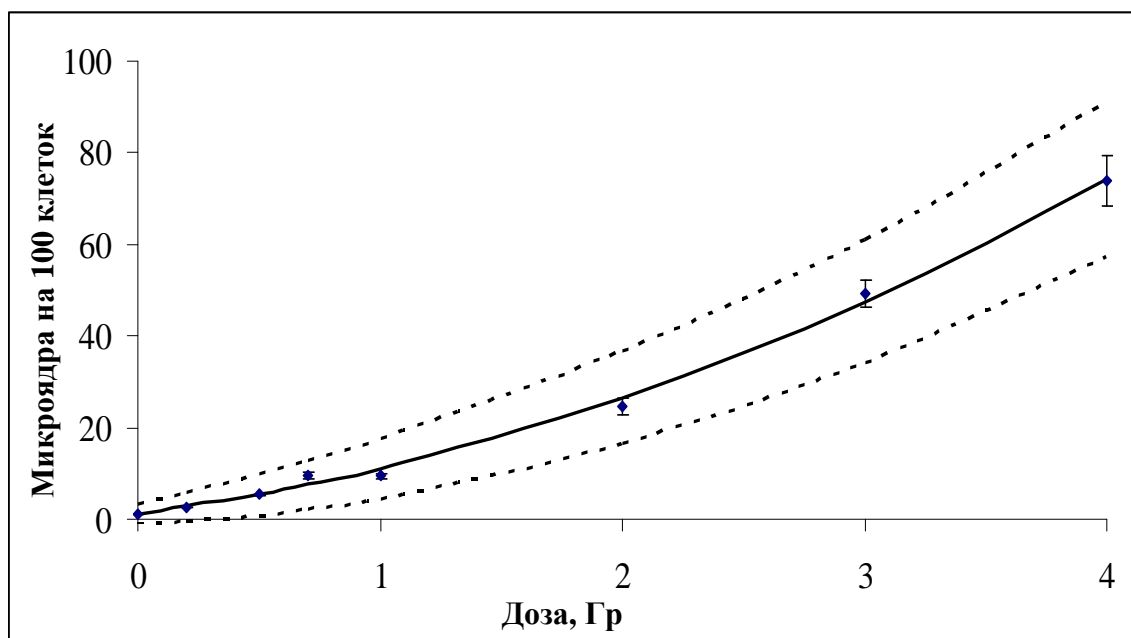


РИС. 40. Типовая линейно-квадратичная кривая доза-эффект микроядер для гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$ . Сплошная кривая: объединенные данные от 47 доноров; пунктирные кривые: верхняя и нижняя граница 95%-ого доверительного интервала.

#### 12.4.2. Фоновая частота

В публикациях сообщается, что фоновая частота микроядер является весьма вариабельной; были зарегистрированы значения в диапазоне от 0 до 40 на 1000 двухъядерных клеток [257–286]. Этими двумя наиболее важными факторами, влияющими на фоновую частоту микроядер, помимо факторов питания [276] и воздействия широкого спектра кластогенов и анеугенов окружающей среды, является возраст и пол [84, 277].

Крупномасштабные биомониторинговые исследования показали, что спонтанный выход микроядер систематически увеличивается с возрастом. Для контрольного населения мужского пола – персонала АЭС и персонала больницы – в исследовании были получены значения 0,35 микроядер на 1000 двухъядерных клеток в год и 0,44 микроядер/1000/год, соответственно [278–280]. Эти значения согласуются с крупномасштабным исследованием Фенеха [108] в отношении переменных, влияющих на фоновую частоту микроядер: 0,31 микроядер/1000/год. Для контрольной группы женщин было выявлено более заметное увеличение: 0,58 микроядер/1000/год [279], что снова согласуется с данными Фенеха [108]: 0,52 микроядер/1000/год. Анализ микроядер на присутствие центромер с использованием панцентромерного зонда FISH (Рис. 41) показал, что увеличение фоновой частоты микроядер с возрастом может быть почти полностью отнесено на центромер-положительные микроядра, что отражает увеличение потери хромосом с возрастом [266, 279, 280].

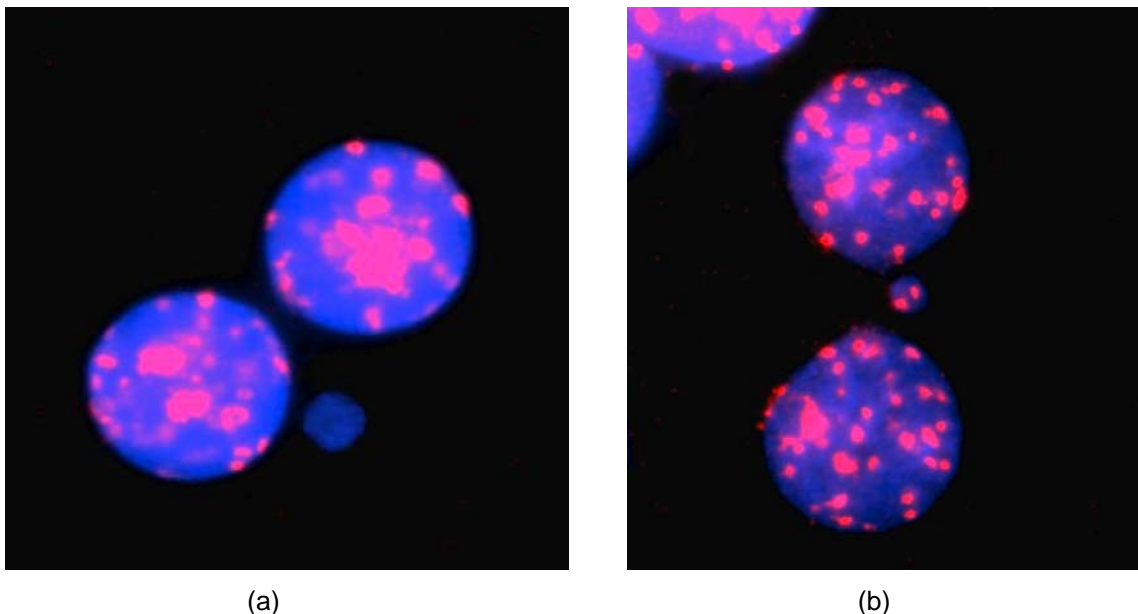


РИС. 41. Двухъядерные клетки, показывающие центромер-отрицательные (а) и центромер-положительные микроядра (b). Центромеры окрашены панцентромерным зондом (*spectrum orange*), а ядра и микроядра контрастно окрашены красителем DAPI.

Х-хромосома почти полностью отвечает за эту спонтанно происходящую потерю хромосомы [281, 282]. Это объясняет также гендерные различия в частоте спонтанных микроядер, когда для популяции со средним возрастом 41,4 и 41,8 года средняя частота спонтанных микроядер составила 16,4 на 1000 двухъядерных клеток для мужчин и 23,5 для женщин, соответственно; для сравнения, различие в центромер-отрицательных микроядрах не является существенным: 6,7 против 7,7 [279].

Эта вариабельность фона налагает выраженные ограничения на использование микроядер в качестве биологического дозиметра для низких доз там, где ранее существовавшие индивидуальные частоты фона неизвестны. Оценки были сделаны исходя из предположения, что CBMN-тест в его базовой форме сможет обнаружить лишь облучения *in vivo*, превышающие 0,2–0,3 Гр рентгеновского излучения [87, 266, 283].

Поскольку было показано, что большая часть радиационно-индуцированных микроядер образуется прежде всего из ацентрических фрагментов, в то время как спонтанные микроядра содержат главным образом целые хромосомы [85, 264–267], использование CBMN-центромерного теста значительно повышает чувствительность CBMN-теста в диапазоне низких доз [85, 266]. В обоих исследованиях [85, 266] с помощью панцентромерного зонда большинство спонтанных микроядер было центромер-положительными ( $\text{MNCM}^{+ve}$ ) (соответственно, 73% и 71%), в то время как большинство радиационно-индуцированных микроядер были центромер-отрицательными ( $\text{MNCM}^{-ve}$ ). Количество  $\text{MNCM}^{+ve}$  лишь очень незначительно увеличивалось с дозой (соответственно 3,7 и 5,3  $\text{MNCM}^{+ve}$  на 1 грей на 1000 двухъядерных клеток). При ручном подсчете  $\text{MNCM}^{-ve}$  в 2000 двухъядерных клетках может быть достигнут предел обнаружения 0,1 Гр при 95%-ом доверительном интервале [266, 267].

#### 12.4.3. Индекс деления ядер

При подсчете препаратов лимфоцитов с блокированием цитокинеза наблюдаются клетки с 1, 2, 3 и т.д. основными ядрами. Относительную частоту этих клеток можно

использовать для определения хода клеточного цикла лимфоцитов после митогенной стимуляции.

Это называется индекс деления ядер [284]. Индекс сам по себе недостаточно надежен для непосредственного использования в качестве биодозиметра. Однако этот анализ часто используется как полезный исследовательский инструмент для обеспечения понимания кинетики клеточного цикла культур. Он указывает на нарушения, которые могут быть вызваны воздействием мутагена, такого как радиация. Данные получают непосредственно из CBMN-теста, без каких-либо дополнительных работ в лаборатории, и поэтому данный метод включен в настоящую публикацию.

#### *12.4.3.1. Критерии подсчета жизнеспособных одноклеточных, двухклеточных и многоклеточных клеток*

Клетки этого типа имеют следующие характеристики:

- Одноклеточные, двухклеточные и многоклеточные клетки являются жизнеспособными клетками с интактной цитоплазмой и нормальной морфологией ядра, содержащие одно, два, три или больше ядер, соответственно.
- Они могут содержать или не содержать одно или более микроядер или ядерных почечек, а в случае двухклеточных и многоклеточных клеток они могут содержать или не содержать один или более нуклеоплазматических мостов.

Некротические и апоптотические клетки не должны включаться в жизнеспособные подсчитанные клетки.

В редких случаях наблюдаются многоклеточные клетки с более чем четырьмя ядрами, если время клеточного цикла намного короче нормального времени или если время блокирования цитокинеза является слишком продолжительным.

#### *12.4.3.2. Вычисление индекса деления ядер*

Были подсчитаны пятьсот жизнеспособных клеток для определения частоты клеток с 1, 2, 3 или 4 ядрами, и был вычислен индекс деления ядер, при использовании формулы (36):

$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (36)$$

где:

$M_1 - M_4$  — число клеток с одним - четырьмя ядрами,

$N$  — общее количество подсчитанных жизнеспособных клеток.

Опубликованные методы вычисления индекса деления ядер [284] не учитывали его неопределенность. Представляется, что метод выведения неопределенности в дальнейшем так и не был опубликован. Поэтому он описан в настоящем издании, и поскольку он сложен, то полный учебный пример с решением приведен в Приложении IV-4.

Вследствие корреляции значений  $M_1 - M_4$ , неопределенность индекса деления ядер невозможно вычислить, используя стандартный анализ ошибок. Вместо этого необходимо учитывать дисперсию, показывающую меру зависимости переменных друг от друга. Можно предположить, что значения  $M_1 - M_4$  в индексе деления ядер образуют полиномиальное распределение, что означает наличие постоянного числа (три или больше) из возможных результатов по числу ядер в клетке — т.е. в данном случае 1, 2, 3 или 4 ядра. Тогда дисперсию ( $var$ ) и ковариацию ( $covar$ ) каждой переменной, от  $M_1$  до  $M_4$  можно вычислить, используя Ур. (37) - (39):

$$\text{var}(M_i) = np_i(1 - p_i) \quad (37)$$

$$\text{cov ar}(M_i, M_j) = -np_i p_j \quad (38)$$

для  $i$  и  $j = 1, 2, 3$  или  $4$

где:

$M_1, M_2, M_3$  или  $M_4$  являются значениями  $1 \times M_1, 2 \times M_2, 3 \times M_3$  и  $4 \times M_4$ ,

$n$  – сумма общего количества клеток, умноженная на их соответствующие количества микроядер (эквивалентно числителю уравнения индекса деления ядер),

$p_i$  and  $p_j$  – вероятности  $M_i$  и  $M_j$ , равные  $M_i$  или  $M_j$ , деленному на  $n$ .

Используя определение ковариации, можно показать, что дисперсия индекса деления ядер зависит от дисперсий и ковариаций, вычисленных при использования Ур. 37 и 38:

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (39)$$

Это вычисление является относительно сложным, но его можно легко выполнить, используя одну из широко доступных статистических программ или программы Dose Estimate, упомянутой в Разделе 8.3.

## 12.5. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (CBMN) В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

### 12.5.1. Исследования на пациентах

Для проверки применимости микроядерного теста с блокированием цитокинеза (CBMN) в биологической дозиметрии были измерены выходы микроядер в лимфоцитах периферической крови 1) различных групп онкологических больных, получающих фракционированную радиотерапию части тела, например, больных раком простаты, раком шейки матки, болезнью Ходжкина [285–288] и 2) больных раком щитовидной железы, получающих радиойодную терапию [289–291].

Эти исследования показали, что дозы, оцененные по методу микроядер, вполне хорошо согласуются с усредненными дозами облучения всего тела, вычисленными из планов радиационной терапии плюс совокупных гистограмм доза-объем [285–287, 292].

Мета-анализ, сосредоточенный на больных раком щитовидной железы [289], показал, что пострadiационное индуцирование микроядер увеличилась больше чем в три раза по сравнению с частотой до облучения; тем самым было показано, что CBMN-тест достаточно чувствителен для обнаружения генетических повреждений в циркулирующих лимфоцитах вследствие облучения с низкой усредненной дозой всего тела от внутренне инкорпорированных источников излучения.

#### 12.5.1.1. Пример радиойодной терапии

Микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN) использовался для изучения реакции лимфоцитов 34-летнего мужчины, прошедшего абляционную лучевую терапию йодом-131 после полной тиреоидэктомии по поводу рака [291]. По счастливой случайности, за несколько месяцев до постановки диагноза пациент добровольно предложил сдать пробу крови для исследования экспрессии микроядер *in vitro* после внешнего облучения возрастающими дозами рентгеновского облучения (198 мГр/мин). Фоновая частота (фон до терапии) в необлученной культуре была в среднем 6,0 микроядер на 1000 двухъядерных клеток, в то время как после доз рентгеновского облучения 50, 100, 150, 200 и 250 мГр были получены средние значения 18,5, 29,0, 41,0, 61,0 и 75,5 микроядер на 1000 двухъядерных клеток, соответственно. Обнаружилось, что эти данные



соответствовали непороговой линейной функции доза-эффект ( $Y = 3,714 + 2,783D$ ;  $r=0,99$ ), как показано на Рис. 42.

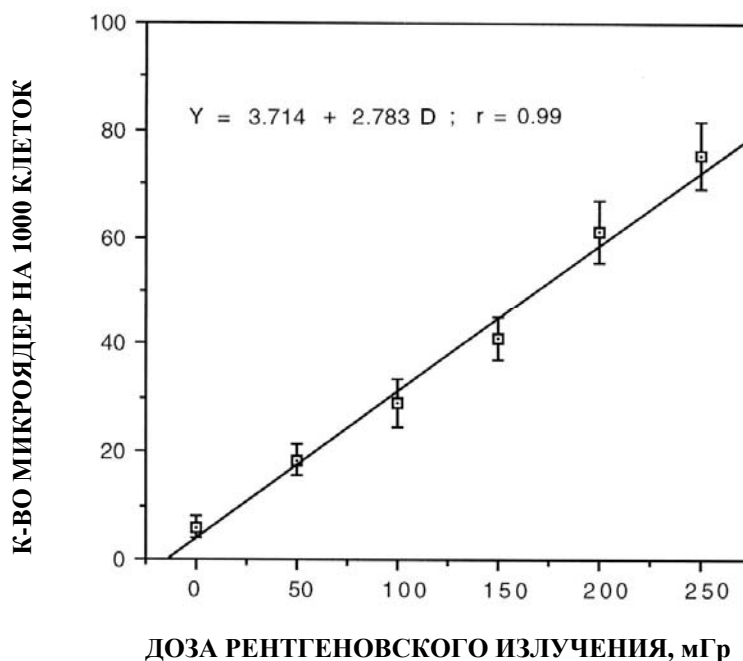


РИС. 42. Доза-эффект микроядер *in vitro* для низких доз рентгеновского излучения в лимфоцитах пациента перед постановкой диагноза и после терапии йодом-131 (с разрешения Livingston, REAC/TS, США).

Кровь была взята спустя 11 дней после первого сеанса лечения йодом-131 *in vivo* с активностью 48 мКи (1,78 ГБк) и ежемесячно после этого, и далее ежеквартально в течение пяти лет. Первая проба крови после лечения показала 35,5 микроядер на 1000 двухъядерных клеток, а шестикратное увеличение по сравнению с фоном до лечения предполагает дозу в периферической крови ок. 110 мГр. Спустя двадцать шесть месяцев после первого курса лечения йодом-131 был проведен второй курс с активностью 390 мКи (14,46 ГБк), который привел к дальнейшему увеличению числа микроядер. Количество микроядер колебалось в широких пределах в течение длительного периода, и в продолжение пяти лет последующего наблюдения приблизительно 10-кратно превышало фоновое значение (Рис. 43).



РИС. 43. Пятилетнее наблюдение пациента по поводу микроядер до, во время и после терапии йодом-131 (с разрешения Livingston, REAC/TS, США).

Спустя больше чем 15 лет после второго курса лечения, рака у пациента не было и он был здоров. Результаты этого исследования поддерживают заключение, что тест CBMN – быстрый, чувствительный и количественный биомаркер радиационного облучения. Однако такие исследования не в состоянии определить местную дозу в ткани-мишени, которая в этом случае была любыми остаточными клетками щитовидной железы плюс метастазы тироидального происхождения.

### 12.5.2. Биомониторинговые исследования

Подтвердив свою действенность в качестве биомонитора *in vivo* в нескольких исследованиях на пациентах, микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN), так же как CBMN-центромерный тест, был применен для крупномасштабного биомониторинга персонала, подвергающегося профессиональному облучению, например, на АЭС и в больницах [266, 278–280, 293–295]. Эти биомониторинговые исследования показали зависимость микроядер от накопленной дозы, полученной за годы, предшествующие забору крови. В исследовании Тиренса и др. [280] линейная регрессия отдельных частот микроядер, скорректированных на возраст (см. Раздел 12.4.2.), показала увеличение 0,0175 микроядер на 1000 двухъядерных клеток/мЗв при значении коэффициента корреляции Пирсона 0,10. Применение Тиренсом и др. [295] CBMN-центромерного теста при втором обследовании персонала, занятого на радиационно-опасных работах, показало почти то же самое увеличение числа микроядер с дозой, 0,025 микроядер на 1000 двухъядерных клеток/мГр и продемонстрировало, что эта зависимость дозы полностью определяется  $MN_{SCM}^{-ve}$ , что указывает на кластогенное действие ионизирующего излучения. Зависимость микроядер от дозы при профессиональном облучении была также выявлена в исследовании Вагленова и др. [296]. Они сообщили об увеличении частоты микроядер, равном 0,03 микроядер, на 1000 двухъядерных клеток/мГр. Крупномасштабные биомониторинговые исследования показывают, что микроядерный тест способен показать генетические повреждения на уровне населения для профессионально полученных накопленных доз, превышающих 50 мГр.

### 12.5.3. Исследования аварий

#### 12.5.3.1. Чернобыльская авария

СВМN-тест был также успешно использован для оценки облучения, растянутого во времени вследствие инкорпорирования долгоживущих радионуклидов, у населения вблизи Чернобыльской АЭС. Восемьдесят человек, находившихся на расстоянии 100-200 км от Чернобыля во время аварии в 1986 г., были проверены на частоту микроядер в двухъядерных лимфоцитах между 1989 г. и 1991 г. [297]. В этом исследовании был выполнен счет всего тела для  $^{134}\text{Cs}$  и  $^{137}\text{Cs}$ , с тем чтобы можно было соотнести частоту микроядер с дозой облучения тела. Многократный регрессионный анализ данных по 80 лицам показал, что (а) частота микроядер была в значительной мере связана с уровнем активности радиоцезия ( $p = 0,004$ ) и (б) оцененная внутренняя – поглощенная доза (в диапазоне от 0,6 до 9,2 мГр) имела значительную и положительную – корреляцию с частотой микроядер ( $R = 0,71$ ).

#### 12.5.3.2. Стамбульская авария

Для аварий с несколькими пострадавшими в случаях, когда скорость получения результатов не была жизненно важна, большинство лабораторий предпочитало использовать анализ дицентриков. По этой причине имеется лишь немного публикаций об использовании микроядер в качестве биологического дозиметра вскоре после аварии. Однако одним из таких примеров является авария в Стамбуле [158, 159], ранее описанная в Разделах 9.7.5.6 и 10.9.3, где десять рабочих склада металлолома были облучены неэкранированным отработавшим радиотерапевтическим источником  $^{60}\text{Co}$ . Лимфоциты, пробы которых были взяты приблизительно через месяц после облучения, были оценены на микроядра при помощи СВМN-теста, а также оценены на дицентрики и транслокации по методу FISH. Используя объединенные данные двух лабораторий, для восьми пациентов были получены оценки дозы на основе микроядер в диапазоне значений 0,7–2,7 Гр, что превосходно согласуется с дозами, полученными по дицентрикам. В Разделе 10.9.3 было отмечено, что оценки дозы по методу FISH были приблизительно на 20-30% выше оценок, основанных на выходах дицентриков, причиной чего, вероятно, является весьма сильное снижение количества клеток крови пациентов. Та же самая тенденция недооценки дозы в такой ситуации была бы применима к микроядерному тесту, поскольку это класс повреждений с ограниченной персистенцией *in vivo*, особенно после больших доз.

#### 12.5.3.3. Семипалатинский ядерный полигон

За 40 лет постоянных испытаний ядерного оружия (1949–1989) зона семипалатинского полигона была чрезвычайно загрязнена радиоактивными осадками. Люди, живущие вблизи полигона, получили как внутреннее, так и внешнее облучение. Анализ дицентриков и микроядер был выполнен для лиц, живущих в различных загрязненных деревнях и в одной контрольной деревне. У жителей загрязненных местностей был выявлен более высокий уровень как дицентриков, так и микроядер, и представляется, что этот более высокий уровень вызван главным образом их внутренне инкорпорированными радионуклидами [298].

#### 12.5.3.4. Авария с установкой контактной рентгеновской радиотерапии при напряжении на трубке 50 кВ

В 2003 г. микроядерный тест с блокированием цитокинеза (СВМN) был применен для ретроспективной оценки дозы, полученной работником больницы, который случайно подвергся облучению от установки контактной рентгеновской радиотерапии с напряжением на трубке 50 кВ при проведении технического обслуживания [299]. Оценка дозы 0,73 Гр была получена с 95%-ым доверительным интервалом 0,54–0,96 Гр. Подсчет дицентриков дал оценку дозы 0,62 Гр (диапазон 0,45–0,90 Гр), что очень хорошо

согласуется с дозой по CBMN-тесту. Поражение кожи на спине работника указывало на переоблучение с частичным облучением тела. Из повышенной дисперсии данных по дицентрикам вывели, что было облучено 49% тела. Было невозможно применить этот тип анализа для данных по микроядрам, поскольку микроядра неизменно показывают повышенную дисперсию, даже в случае облучения всего тела. Вторым образцом крови, взятый 1 год спустя, показал, что выход микроядер уменьшился с течением времени после облучения. Время полувыведения составляло 342 дня – очень близко к значению 377 дней, полученному для дицентриков. Этот результат согласуется со снижением частоты микроядер с течением времени после облучения до приблизительно 60% через 1 год после лечения, наблюдаемого у пациентов радиотерапии [292].

#### *12.5.3.5. Крупномасштабные радиационные аварии*

В случае крупномасштабных радиационных аварий, когда могут быть облучены сотни людей, важно отличить серьезно облученных лиц ( $\geq 1$  Гр), которым требуется медицинская помощь на раннем этапе, от менее облученных. Для этого необходим биологический дозиметрический экспресс-анализ. В одном из недавних исследований [87] эффективность автоматизированного подсчета микроядер для быстрой сортировки населения была подтверждена в мультицентровом проекте. Более подробная информация приведена в Разделе 13.3.3.

### **13. АВТОМАТИЗАЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ АНАЛИЗОВ**

Для действенной готовности к реагированию на радиационные события с большим количеством пострадавших появилась настоятельная необходимость автоматизировать цитогенетические методы оценки дозы для повышения пропускной способности, поскольку эти методы являются трудоемкими и утомительными. Кроме того, автоматизация также улучшает контроль качества и обеспечение качества. К тому же автоматизация повышает безопасность лабораторного персонала, поскольку протокол связан с обработкой крови, что является профессиональным фактором биологической опасности. Автоматизация цитогенетической лаборатории включает следующее: (i) автоматизация подготовки проб крови, (ii) автоматизация выполнения анализа, и (iii) система управления лабораторной информацией для отслеживания проб и обращения с данными [300].

#### **13.1. АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ОБРАБОТКА ПРОБ КРОВИ**

Автоматизированная обработка проб крови в цитогенетической лаборатории может включать следующие установки в полной или частичной комплектации: (i) робот-манипулятор проб крови, (ii) ламинарный шкаф, (iii) инкубаторы, (iv) коллектор метафаз, (v) система получения метафазных пластинок, (vi) система окрашивания препаратов.

##### **13.1.1. Робот-манипулятор проб крови**

Автоматизированный высокопроизводительный робот-манипулятор жидкостей для обработки проб крови и выделения лимфоцитов из периферийной цельной крови, разработанный с учётом потребностей заказчика, может устранить серьезное ограничение скорости обработки образцов крови для цитогенетической оценки дозы [300]. Коммерчески доступные роботы-манипуляторы жидкостей, способные дозировать, разбавлять и аспирировать пробы крови, которые были разработаны для создания банков крови [301], могут быть адаптированы к требованиям заказчика и использоваться по заданному назначению. Эти системы точны, надежны, и не допускают перекрестного загрязнения образцов [302]. Роботизированная станция-манипулятор крови, разработанная с учётом потребностей заказчика, может быть оборудована большой специализированной рабочей платформой, считывателем штрих-кода для документирования цепочки передачи проб, роботизированными руками-манипуляторами для обращения с жидкостями и передачи вакутейнеров и пробирок для центрифугирования, и мойки для наконечников пипеток. Робот может также быть объединен с анализатором жизнеспособности клетки для корректировки плотности лимфоцитов при постановке культур, и автоматизированной свинговой бакетной центрифугой для выделения лимфоцитов в градиенте плотности при постановке выделенных культур лимфоцитов. При этом все оборудование должно быть заключено в среду с инженерно-техническими средствами биобезопасности 2 уровня для обеспечения стерильности проб и охраны труда лабораторного персонала. Система должна обеспечивать положительную цепь ответственности и обеспечения сохранности [301].

##### **13.1.2. Коллектор метафаз**

Для систематического и надежного получения высококачественных метафазных пластинок можно использовать коммерчески доступные коллекторы метафаз, адаптированные для заказчика, для сбора метафаз из культуры клеток крови. Эти устройства выполняют повторяющиеся операции, связанные со сбором метафазы из культур, такие как центрифугирование суспензий клеток, аспирация и безопасное удаление супернатанта, обработка гипотоническим раствором и фиксация клеток смесью уксусной кислоты с метанолом, устраняя тем самым трудоемкость процесса. Эти

операции выполняются в условиях контролируемой среды, как одношаговый протокол, без взаимодействия с пользователем, что повышает качество и воспроизводимость процесса [300].

### **13.1.3. Система получения метафазных пластинок**

На распределение метафаз по предметным стеклам влияет температура и влажность [303]. Автоматизированная система обеспечивает оптимальные условия температуры и влажности окружающей среды во время распределения суспензии клеток по предметным стеклам, и обеспечивает большую пропускную способность, чем можно достичь вручную. Система получения метафазных пластинок может быть оснащена микропроцессором для точного уравнивания температуры, влажности и времени сушки и управления этими параметрами. Эти средства управления, в соединении с функциональной формой системы, позволяют различным пользователям получать достоверные результаты как для клеток человека, так и для клеток животных. Встроенное герметизируемое направляющее устройство пипетки обеспечивает систематическое распределение проб и помогает предотвращать перекрестное воздействие проб.

### **13.1.4. Система автоматического окрашивания препаратов**

Система обеспечивает быстрый и надежный метод окрашивания препаратов красителем Гимза с минимальным привлечением оператора. Имеющиеся в настоящее время системы автоматического окрашивания позволяют интеллектуальное и гибкое плановое окрашивание и ополаскивание от 1 до 520 препаратов с одинаковыми или различными протоколами без присутствия оператора. Функция задания приоритета позволяет ставить в очереди и обрабатывать определенные партии проб раньше других партий без привлечения пользователя. Встроенный резервный аккумулятор может гарантировать до 40 минут времени на продолжение выполняемой обработки проб в случае отключения электропитания.

## **13.2. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ**

Многие лаборатории еще рутинно не используют автоматизированный анализ изображений, полученных под микроскопом, для биологической дозиметрии, хотя по мере совершенствования систем этот анализ будут использовать чаще. Были предприняты попытки автоматизировать подсчет для всех четырех видов анализа, описанных в настоящей публикации.

### **13.2.1. Поиск метафаз и захват изображений**

В то время как автоматизированные аналитические установки с полной надежностью подсчета цитогенетических повреждений все еще находятся в процессе разработки, высокопроизводительные системы поиска метафаз и сопутствующие системы подсчета для компьютеризованного ручного анализа уже могут значительно повысить производительность оператора. Системы поиска метафаз помогают находить на стеклах метафазные пластинки и представляют их в фокусе, с сильным увеличением, готовыми к анализу [304, 305].

Традиционная система поиска метафаз, основанная на анализе изображений, может состоять из компьютера, цифровой фотокамеры с высоким разрешением, высококачественного микроскопа с автоматизированным предметным столиком с самофокусировкой и роботизированного устройства подачи предметных стекол. Для анализа хромосомных aberrаций в компьютер загружается программное обеспечение для автоматизированного поиска метафаз и программное обеспечение для интерактивного автоматизированного подсчета и аннотирования. Такие системы поиска метафаз могут сканировать до 150 стекол за один прогон в поиске метафазных пластинок [300]. При

выполнении сканирования результаты (изображения и места потенциальных метафазных пластинок) сохраняются на централизованном сервере для последующего автоматического перемещения на многочисленные сопутствующие системы подсчета для анализа хромосом. Альтернативно, виртуальные изображения метафазных пластинок с высоким разрешением, полученные системами поиска метафаз, могут быть зашифрованы в цифровой форме и переданы через виртуальную частную сеть на нижние уровни для удаленного анализа и оценки. Для обеспечения сопоставимых результатов при таком «удаленном подсчете» требуется разработка гармонизированных критериев подсчета.

### **13.2.2. Автоматизация анализа дицентриков**

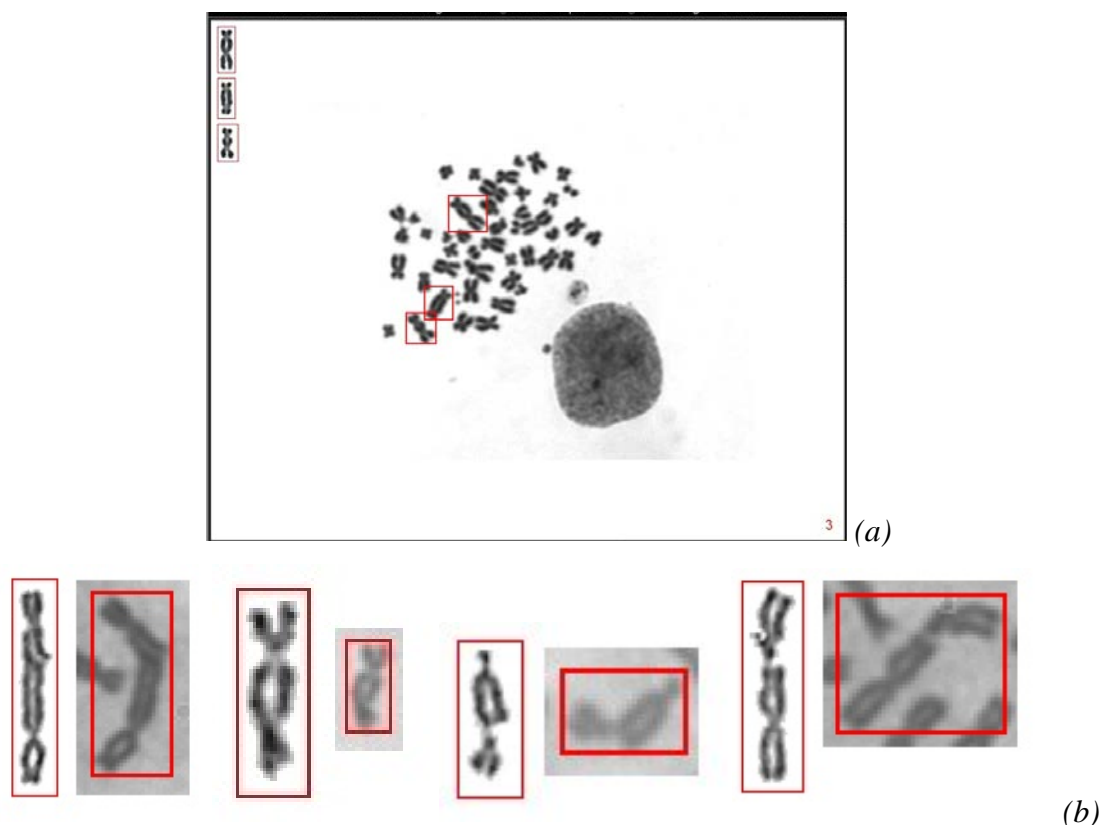
Микроскопический анализ дицентрических хромосом является трудоёмкой процедурой, рутинно выполняемой в лабораториях биологической дозиметрии хорошо подготовленными и опытными специалистами по подсчету, которым приходится анализировать несколько сотен клеток в день. При низких дозах необходимо анализировать большое количество метафаз, и поэтому основной стратегией совершенствования метода является автоматизация подсчета дицентриков для экономии времени, в частности, для оценки облучения низкими дозами радиации.

Начиная с 1980-ых годов, было сделано несколько попыток разработать автоматические системы подсчета [306–308]. С того времени появилось несколько доступных коммерческих систем, и соответствующие программные модули поиска метафаз и кариотипирования в настоящее время прочно обосновались во многих цитогенетических лабораториях. Такая компьютеризованная микроскопия чрезвычайно облегчает работу. Сначала предметное стекло сканируется с небольшим увеличением, обнаруживаются метафазы, и их координаты сохраняются в неконтролируемом режиме. Во время этой процедуры можно создать галерею обнаруженных метафаз. Поскольку клетки перемещаются и анализируются вручную, можно легко вести, распечатывать и архивировать индивидуализированные электронные ведомости подсчета в виде файлов. Во время быстрого реагирования на чрезвычайную радиационную ситуацию наблюдаемые аберрантные клетки можно сразу же вручную выявить, оцифровать и заархивировать. При использовании системы поиска метафаз можно добиться сокращения общего времени подсчета в два раза [304].

Уже давно стало ясно, что после автоматического поиска метафаз, фиксации изображений и других процессов должен выполняться электронный анализ изображений для реализации автоматического анализа хромосом, включая подсчет дицентриков. Автоматический подсчет дицентриков выполняется в несколько этапов. Сначала стекло сканируется системой поиска метафаз. На втором этапе обнаруженные метафазы автоматически фиксируются и оцифровываются с высоким разрешением. Далее изображения метафаз сегментируются для идентификации хромосом и кандидатных дицентриков. В 1990-ые годы сохранялись лишь изображения кандидатных дицентриков и их координаты. В настоящее время благодаря прогрессу в оцифровке отображений эта процедура стала намного быстрее и эффективней. Кроме того, достижения в технологиях жесткого диска позволяют теперь сохранять все клетки одного предметного стекла в режиме высокого разрешения.

Опыт программного обеспечения для подсчета дицентриков показывает, что разработка иерархических многошаговых алгоритмов, позволяющих сегментацию полной клетки с получением 46 хромосом, представляет значительные трудности [308, 309]. Обычно некоторые хромосомы не обнаруживаются, поскольку они наложились друг на друга или лежали близко друг к другу как хромосомные кластеры. Как следствие, некоторые дицентрики будут пропущены (ложно-отрицательные результаты). Кроме того, некоторые дицентрики могут систематически не замечаться, потому что они меньше по

размеру, чем X хромосома, что может относиться менее чем к 8% дицентриков. Автоматически обнаруженные кандидатные дицентрики должны быть утверждены подготовленным специалистом по подсчету, но этот процесс намного быстрее и легче, чем ручной подсчет. Кандидатные дицентрики высвечиваются на экране с отметкой (Рис. 44а), что позволяет быстро выполнять оценку. Большинство ложно-положительных результатов (т.е. артефактов, наложений хромосом, см. Рис. 44б) могут быть легко отклонены.



*РИС. 44. а) Автоматически обнаруженные кандидатные дицентрики идентифицируются, что облегчает и убыстряет оценку. б) Ложно-положительные кандидатные дицентрики (то есть накладывающиеся хромосомы, перекрученные хроматиды или несегментированные объекты) можно легко распознать и отклонить.*

Поскольку анализируются не все клетки (в соответствии с ручным стандартом подсчета учитываются лишь полные клетки с 46 центромерами) и возникает соответствующая неопределенность, автоматизированный подсчет дицентриков пока еще не утвердился как рутинный метод. Кроме того, требуются данные, чтобы решить, следует ли связывать обнаруженную частоту дицентриков с числом обнаруженных хромосом, или ее можно считать как число дицентриков на клетку, принимая во внимание, что число хромосом, оцениваемых в каждой клетке, не является постоянным. Отсюда возникают вопросы об использовании индекса избыточной дисперсии дицентриков (Раздел 9.7.4.3), и, следовательно, о потенциале этого метода для выявления частичных облучений тела. Еще одним вопросом, представляющим интерес, может быть влияние качества подготовки препаратов. Хорошие метафазные пластинки позволяют увеличить число обнаруженных хромосом. Здесь необходимы дальнейшие исследования с использованием возможности оптимизировать классификатор дицентриков до качества метафазных препаратов лаборатории.



Автоматическое обнаружение дицентриков дает результаты высокой степени воспроизводимости. Сравнение кривых доза-эффект, полученных при ручном и полуавтоматическом подсчете, демонстрируют очень хорошую корреляцию между обоими методами. Сообщается, что эффективность обнаружения дицентриков при помощи автоматизированных систем составляет приблизительно 50-70% [310, 311].

Благодаря автоматизации подсчета дицентриков появилась возможность усовершенствовать анализ дицентриков в качестве ценного инструмента скрининга большого количества проб крови в случае крупномасштабной радиационной чрезвычайной ситуации. К одному автоматизированному рабочему месту можно добавить сопряженные рабочие места для оценки клеток и дицентриков, что увеличит производительность и пропускную способность системы. Для работы в режиме сортировки автоматизация подсчета дицентриков значительно уменьшает время анализа, а результаты хорошо коррелируют с ручным подсчетом [300, 310, 311].

### **13.2.3. Автоматизированный подсчет микроядер**

Еще в 1990-ые годы было разработано несколько алгоритмов для автоматизированного анализа изображений микроядерного теста с блокированием цитокинеза (CBMN) [312, 313]. Однако те системы имели такие ограничения, как относительная высокая неточность классификации двухъядерных клеток. Позже были разработаны новые и более совершенные автоматизированные системы анализа изображений для CBMN-теста. Программный модуль микроядерного теста, встроенный в систему поиска метафаз MSearch, разработанный и коммерциализированный компанией Metasystems (изготовитель систем визуализации микроскопических изображений), автоматически идентифицирует по морфологическим критериям двухъядерные клетки по наличию двух смежных ядер, одинаково окрашенных красителем DAPI. На втором этапе микроядра считаются автоматически в кольцевой зоне, определенной вокруг двух ядер двухъядерных клеток [314, 315] (см. галерею двухъядерных клеток с микроядрами, Рис. 45). Дальнейшей оценки обнаруженного выхода микроядер специалистом по подсчету не требуется. Важно отметить, что в отличие от визуальных критериев подсчета для CBMN-теста, программное обеспечение Metasystems не использует границу цитоплазмы для идентификации двухъядерных клеток, но просто предполагает, что непосредственная близость двух ядер (удовлетворяющая определенным показателям в классификаторах распознавания образов программного обеспечения) достаточна для точной идентификации двухъядерной клетки; при необходимости, границу цитоплазмы можно визуализировать при помощи фазово-контрастной микроскопии, как рекомендуется Истмондом и Такером (1989) [284], для проверки точности обнаружения двухъядерных клеток.

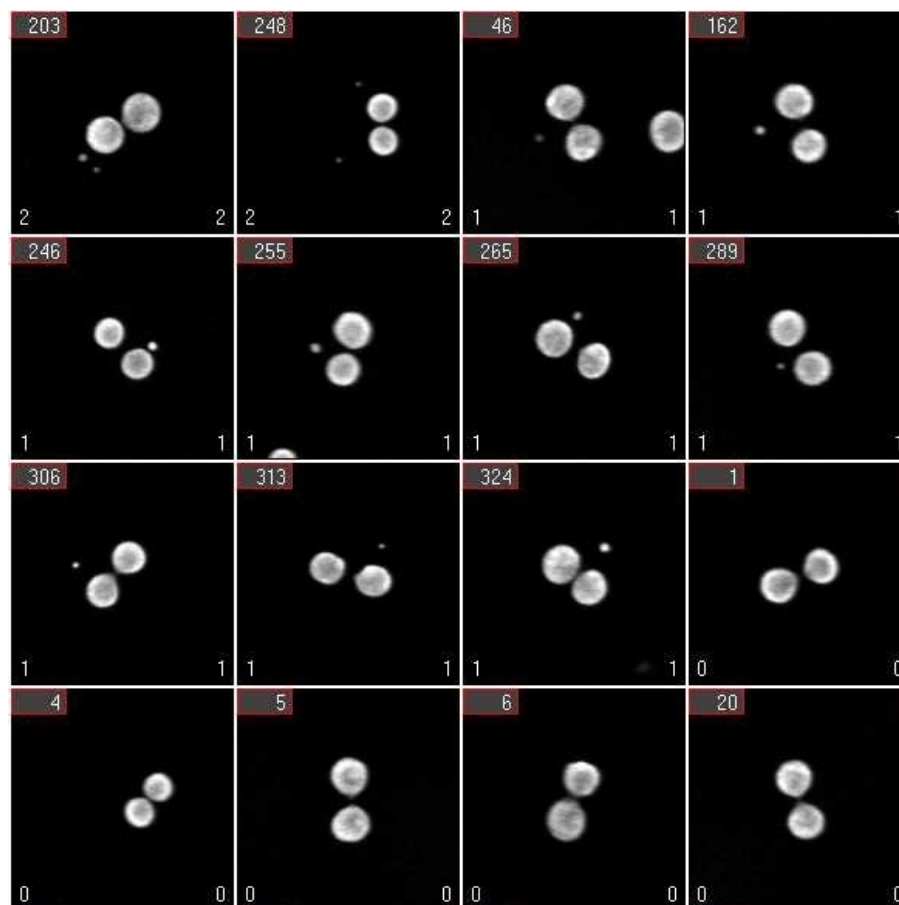


РИС. 45. Галерея двухъядерных клеток с захватом и без захвата микроядер автоматизированной системой

В системе, разработанной Декордые и др. [316] для биомониторинга облучения мутагенными агентами *in vivo*, используется блок захвата изображений и два автоматизированных рабочих места для анализа микроядер. Эта система сначала идентифицирует цитоплазму клеток, окрашенных красителем Гимза, затем детектирует число ядер в клетке, что позволяет идентифицировать двухъядерные клетки, а на третьем этапе выполняется подсчет микроядер.

Исследование, выполненное Уиллемсом и др. [87], продемонстрировало пригодность и преимущества автоматизированного подсчета микроядер для сортировки населения в случае крупномасштабных радиационных чрезвычайных ситуаций, где важно отличать серьезно облученных людей ( $\geq 1$  Гр), кому необходима медицинская помощь и наблюдение на раннем этапе, от менее облученных лиц.

Результаты полностью автоматизированного подсчета микроядер, полученные в вышеуказанном исследовании, очень хорошо коррелировали с подсчетом микроядер, полученным вручную ( $r^2 = 0.917$ ), и продемонстрировали отсутствие необходимости визуального подтверждения [87]. Эталонная кривая доза-эффект, полученная для автоматизированного подсчета микроядер, основанная на данных по микроядрам для десяти человек, показала, что неопределенность при определении дозы 1 Гр составляет 0,2 Гр. 95%-ые доверительные интервалы доз 0 Гр и 1 Гр не перекрывались. Точные оценки дозы были также достигнуты для более высоких доз 2 Гр и 3 Гр. Таким образом, система подсчета микроядер способна различить облучения дозами 1, 2 или 3 Гр. В вышеуказанном исследовании считалось, что 2 специалиста по подсчету могут обрабатывать как минимум 60 проб крови (120 предметных стекол) в течение 12-часовой смены.

В целом, число анализируемых проб крови можно экстенсивно увеличить при использовании большего числа автоматизированных рабочих установок. При этом сеть лабораторий с подготовленным персоналом, имеющих аналогичное оборудование и классификаторы микроядер, где используются стандартизированные протоколы фиксации, может дать сопоставимые результаты. При помощи этих средств производительность автоматизированного подсчета микроядер можно увеличить таким образом, чтобы обеспечить оперативное реагирование на крупномасштабную радиационную чрезвычайную ситуацию.

#### **13.2.4. Анализ преждевременной конденсации хромосом**

Метод в основном подобен методу для анализа дицентриков, где используется автоматизированный поиск метафаз в препаратах, окрашенных красителем Гимза [75]. Далее изображения поступают оператору для подсчета на глаз. Скорость анализа приблизительно в три раза выше, чем полностью ручной анализ.

#### **13.2.5. Анализ транслокаций по методу FISH**

Значительного успеха удалось добиться при использовании FISH-окрашивания 3 или 4 пар хромосом [75]. Была разработана система, состоящая из персонального компьютера и охлаждаемой ПЗС-камеры. Она была основана на двухэтапном подходе: поиск метафаз с использованием флюоресцентного контрастного окрашивания с последующей детекцией транслокаций, вовлекающих хромосомы, маркированные цельнохромосомным красителем. Из списка кандидатных транслокаций ложноположительные и ложно-отрицательные результаты на флюоресцентно-окрашенных препаратах лимфоцитов были получены приблизительно в таких же количествах (ок. 10%), как сообщалось и для кандидатных дицентриков на препаратах, окрашенных красителем Гимза [317]. Для флюоресценции потребовалось более длительное время скрининга: 1 час на одно предметное стекло, из них 25 минут на автофокусировку (по сравнению с несколькими минутами на одно предметное стекло для светопольной микроскопии). Поэтому с ПЗС-камерой используется большая интегральная схема для увеличения скорости подсчета. Для детектирования хромосомных красителей представляется достаточным использовать относительно простой порог, основанный на гистограмме градаций серых тонов, совместно с некоторыми морфологическими операциями, с тем чтобы обнаруживать хромосомы или части хромосом, меченные цельнохромосомным окрашивающим зондом [318]. Возможность применения такой системы для подсчета транслокаций была проверена в исследовании, задачей которого было обнаружение транслокаций, индуцированных рентгеновским излучением, вовлекающим хромосому #4. Было выполнено сравнение между автоматическим и ручным подсчетом, и эффективность автоматического анализа составила приблизительно 90% от результата, полученного вручную.

При увеличении числа гибридизированных хромосом в одном цвете можно повысить чувствительность метода. Однако при большем числе окрашенных хромосом важно наличие процедур для различения возможного соприкасания и/или наложения хромосом [319]. Пайпер и др. [320] сообщили о создании системы флюоресцентного поиска метафаз с коммерчески доступными аппаратными средствами и стандартным автоматизированным рабочим местом Unix. Использовался коктейль трех хромосом #1, #2 и #4, и результаты сравнивались с ручным подсчетом. Результаты показали, что время, необходимое для анализа, было сокращено в три раза. Кроме того, искатель метафаз нашел больше поддающихся подсчету пластинок, чем визуальный просмотр. У машинного подсчета имеются дополнительные преимущества, в частности, оцифрованные изображения метафаз иногда помогают анализировать хромосомные перестройки, поскольку их можно легко вызвать для повторной проверки и дальнейшего

анализа. Эта система была позже модифицирована за счет использования дерева двоичных решений для классификации наблюдаемых метафаз и для повышения точности сканирования [321]. Еще одно преимущество хранения оцифрованных цветных изображений в компьютере состоит в том, что они могут быть увеличены с помощью электроники, и это иногда может обеспечить лучшую дифференциацию очень малых транслоцированных частей хромосом, чем визуальный просмотр.

Очевидным направлением деятельности, куда сейчас направлены усилия, является анализ многоцветных препаратов FISH путем комбинации хромосом-специфических и центромер-специфических библиотек ДНК для автоматизированного одновременного анализа транслокаций и дицентриков.

### 13.3. СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ (LIMS)

Коммерчески доступная система управления лабораторной информацией (LIMS), адаптированная для пользователя, может стать незаменимым инструментом решения проблем, возникающих при повышенной производительности лаборатории по подготовке/анализу проб. Кроме того, LIMS может помочь вести общелабораторную документацию относительно обучения персонала, калибровки аппаратуры, реагентов и т.д. Электронное управление данными через LIMS дает преимущества, включающие возможность связывать, искать и извлекать данные и оперативно сообщать результаты в случае радиационной аварийной ситуации. Система состоит из нескольких модулей, и ниже приведено их краткое описание:

- **Идентификация проб крови** — Пробам присваивается уникальный штрих-кодовый идентификатор.
- **Транспортировка проб крови** — Структурированные шаблоны для ввода данных об условиях во время транспортировки проб и по прибытию проб на место (например, данные журнала температуры).
- **Постановка анализов** — Назначение соответствующей обработки и цитогенетических тестов для любой пробы (например, культивирование цельной крови или выделение лимфоцитов; анализ дицентриков или CBMN-тест).
- **Разработка графика для проб** — Приоритезация анализа проб в зависимости от срочности случая и их распределение определенному лабораторному персоналу.
- **Безопасность** — Требование опознавания пользователя через пароли. Пользователям можно назначить различные полномочия в подсистеме.
- **Аудит** — Прослеживание записей и модификаций.
- **Архивирование** — Поддержание эффективной работы базы данных, поддержание целостности записей и гарантия надежного резервирования научной информации.
- **Отчеты** — Генерирование форматированных отчетов об отдельных случаях, которые можно передавать лечащему врачу.
- **Интеграция аппаратуры** — Данные можно автоматически собирать и сортировать непосредственно из составляющих модулей, уменьшая таким образом риск ошибок транскрипции. Это помогает повысить точность и согласованность данных, что критически важно во время реагирования на событие с большим числом пострадавших.

На Рис. 46 схематически представлена масштабируемая и автоматизированная высокопроизводительная цитогенетическая лаборатория [301, 302].

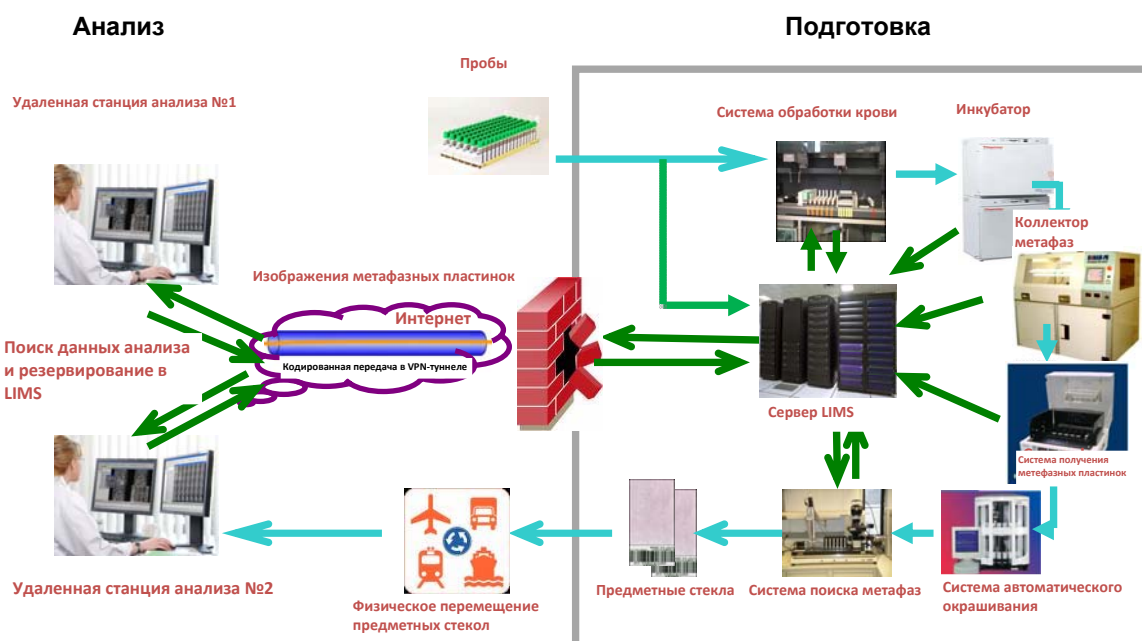


РИС. 46. Схематическое представление высокопроизводительной цитогенетической лаборатории и автоматизации с использованием сети LIMS. Предметные стекла из центральной лаборатории, могут физически передаваться на станции/лаборатории подсчета, или захваченные изображения могут безопасно передаваться в электронном виде в принимающие лаборатории для проведения анализа (с разрешения Ramakrishna & Prasanna, AFRRI, США).



## 14. СОБЫТИЯ С БОЛЬШИМ ЧИСЛОМ ПОСТРАДАВШИХ

Событие с большим числом пострадавших определяется как событие, связанное с поражением такого числа людей, что это превышает возможности реагирования лиц, осуществляющих аварийное реагирование на местном уровне [322, 323]. Когда событие этого типа связано с радиацией, оно может охватывать значительную часть населения, которое могло получить дозы радиации в диапазоне от фона до значений, достаточно больших для того, чтобы вызвать медицинские последствия. Для этих лиц необходимо оперативно выполнить оценку уровней облучения, чтобы определить, требуется ли медицинское вмешательство [4, 322, 324–326].

События, связанные с радиацией, могут быть следствием аварий или злонамеренных действий, причем и в том и в другом случае, если эти события произойдут, среди пострадавших могут оказаться лица из населения. Могут также присутствовать отягощающие факторы, такие как обычные травмы, и в первую очередь необходимо заниматься опасными для жизни травмами, а потом выполнять дозиметрию и другие действия [327].

Для эффективного ответа на событие с большим числом пострадавших критически важно планирование и подготовка. В случае радиационной чрезвычайной ситуации общепринятые руководящие принципы включают: а) создание и обучение местных и национальных групп реагирования, оснащенных критически важным оборудованием и принадлежностями, б) знание и умение применить соответствующий доступный диагностический подход для оценки радиационного поражения и дозы, и с) возможность установления обмена информацией с референс-лабораториями, включая экспертные лаборатории, для оценки дозы методами цитогенетической биологической дозиметрии [322, 328, 329]. Важным компонентом «концепции действий» в биологической дозиметрии является процесс приоритезации взятия проб для оперативной цитогенетической оценки дозы с целью сортировки, для чего требуется динамическая связь между лицами, осуществляющими медицинское реагирование, и персоналом цитогенетической биологической дозиметрической референс-лаборатории.

### 14.1. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СЦЕНАРИИ РАДИАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

#### 14.1.1. Злонамеренные события

Был идентифицирован ряд возможных сценариев со злонамеренным радиационным облучением, которые перечислены ниже в трех широких категориях [322, 324, 326].

- а) Радиационные облучающие устройства (РОУ) включают герметичные источники, размещенные в окружающей среде, но не представляющие угрозы загрязнения. Лица, приблизившиеся к этим источникам, могут получить значительные локализованные дозы, но, как прогнозируется, число лиц с высоким уровнем облучения будет мало.
- б) Радиологические диспергирующие устройства (РДУ) используют взрывчатые или механические устройства для распространения радиационного материала, вызывающего радиоактивное загрязнение. Будет затронута относительно небольшая площадь, а радиационное облучение может выразиться как во внутреннем, так и во внешнем загрязнении, однако предполагается, что уровни облучения будут ниже медицински значимых величин.
- с) Импровизированные ядерные устройства (ИЯУ) содержат ядерный материал, который может произвести ядерные взрывы. Это может вызвать обширные радиационные и термические травмы и гибель большого числа людей, а также появление большого числа пострадавших с высокими дозами облучения. Результат такого события может быть катастрофическим.

### 14.1.2. Аварийные события

К радиационному облучению могут привести несколько сценариев, описанных ниже, но не только они [326]:

- а) Аварийные ситуации на реакторе могут произойти в случае нарушения герметичности облученных твэлов при потере теплоносителя. В результате этих аварийных ситуаций работники и лица из населения, находящиеся вблизи площадки, могут получить высокие дозы, и возникает загрязнение, приводящее к низким дозам для населения в окрестной местности (например, Чернобыль).
- б) Аварии с возникновением критичности могут произойти в случаях, когда непреднамеренно допускается деление достаточного количества специального ядерного материала. Это приводит к высоким уровням облучения лиц в непосредственной близости от места аварии (например, Токай-мура).
- в) Аварийные ситуации, связанные с утерянными или похищенными бесхозными источниками, могут привести к нескольким сценариям облучения в зависимости от активности, длительности облучения и распределения источника. Такие аварийные ситуации могут привести к высоким дозам для всего тела или ограниченных участков тела, а также к внутреннему или внешнему радиоактивному загрязнению (например, Гояния).

### 14.2. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОПЫТ

В недавнем прошлом было несколько примеров использования цитогенетической биологической дозиметрии для оценки радиационного облучения людей после аварийных событий с большим числом пострадавших (Таблица 17).

ТАБЛИЦА 17. ОТДЕЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ АВАРИЯХ С БОЛЬШИМ ЧИСЛОМ ПОСТРАДАВШИХ

| Год аварии | Место аварии       | Число задействованных людей | К-во цитогенетических анализов |     |      |                  | Ссылки          |
|------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----|------|------------------|-----------------|
|            |                    |                             | Дицентрики                     | PCC | FISH | CBMN             |                 |
| 1986       | Чернобыль, Украина | > 100 000                   | 436                            |     |      |                  | [342, 343, 344] |
|            |                    |                             | 1755                           |     | 97   |                  | [235, 236, 347] |
|            |                    |                             |                                |     |      | 140 <sup>a</sup> | [259, 260, 297] |
| 1986–1987  | Лило, Грузия       | 11                          | 11                             |     | 4    |                  | [247]           |
| 1987       | Гояния, Бразилия   | 250                         | 129                            |     |      |                  | [248]           |
|            |                    |                             |                                |     |      |                  | [350]           |
| 1995       | Стамбул, Турция    | 21                          | 21                             | 10  | 5    | 10               | [158]           |
|            |                    |                             |                                |     |      |                  | [349]           |
| 1998       | Матходжи, Грузия   | много                       | 85                             |     |      |                  | [333]           |
| 1999       | Токай-мура, Япония | 43                          | 43                             |     |      |                  | [351]           |
|            |                    |                             |                                | 3   |      |                  | [253]           |
|            |                    |                             |                                |     |      |                  | [254]           |
| 2000       | Бангкок, Таиланд   | много                       | 28                             | 28  |      |                  | [352]           |
| 2005       | Консепсьон, Чили   | 233                         | 45                             |     | 1    |                  | [353]           |
| 2006       | Дакар, Сенегал     | 63                          | 33                             |     |      |                  | [354]           |

<sup>a</sup> Ретроспектива



У аварий могут быть различные особенности, например, это может быть внезапное распознанное событие с большим числом идентифицированных пострадавших за короткий период времени (например, Чернобыль), или более медленно развивающаяся ситуация с отсроченным обнаружением облученных лиц (например, Гояния). Авария могла повлечь лишь несколько реальных медицинских случаев, но вызвать огромное общественное давление, с тем чтобы расширить биологическую дозиметрию на окружающее население, хотя доказательств, оправдывающих эти меры, было либо мало, либо не было совсем (например, Токай-мура). В данном конкретном случае, лаборатория цитогенетической биологической дозиметрии Национального института радиологических наук (NIRS) смогла определить дозы для 265 обеспокоенных людей через обследование той местности, где они находились во время события и заверить их, что они не получили значительной дозы [330]. Для когорты из 43 человек на предприятии по переработке урана, легкое облучение которых было подтверждено на основе измерения радиоактивности всего тела по  $^{24}\text{Na}$ , доза также была оценена путем анализа хромосомных аберраций.

Исторически, цитогенетическая биологическая дозиметрия, использующая анализ дицентриков наряду с обычным подсчетом лейкоцитов, применяется в качестве первоначального количественного анализа для оценки доз после аварийных облучений с большим числом пострадавших (см. Таб. 17). Другие цитогенетические анализы (FISH, PCC и CBMN) использовались для подтверждения оценок дозы, однако эти виды анализа часто выполнялись спустя месяцы или годы после аварии.

### 14.3. РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

#### 14.3.1. Методы оценки радиационного облучения

После радиационного события с большим числом пострадавших врачи прежде всего озабочены сохранением жизни и оценкой медицинских признаков и симптомов для принятия решений об оперативном начале лечения. Для ранних этапов острого облучения применим ряд оценок радиационного облучения, полученных консенсусом международных экспертов [6, 25, 322, 325–327, 329]. В зависимости от сценария облучения и доступных ресурсов, следует реализовать соответствующие методы оценки облучения при радиационной чрезвычайной ситуации с большим числом пострадавших.

#### 14.3.2. Концепция действий в биологической дозиметрии

Общие руководящие принципы «концепции действий» для лиц, принимающих первые ответные меры при радиологическом инциденте с большим числом пострадавших, хорошо описаны в публикациях МАГАТЭ [322, 323] и на сайте Министерства здравоохранения США [331]. Однако в отсутствие доступа к группам экспертов выполнение оценки путем мультипараметрической биологической дозиметрии при радиационной чрезвычайной ситуации с большим числом пострадавших может значительно исказить результаты [322, 323]. Рис. 47 иллюстрирует компоненты стратегии оказания медицинской помощи REAC/TS и AFRRI и концепцию действий для использования мультипараметрической биологической дозиметрии [329].

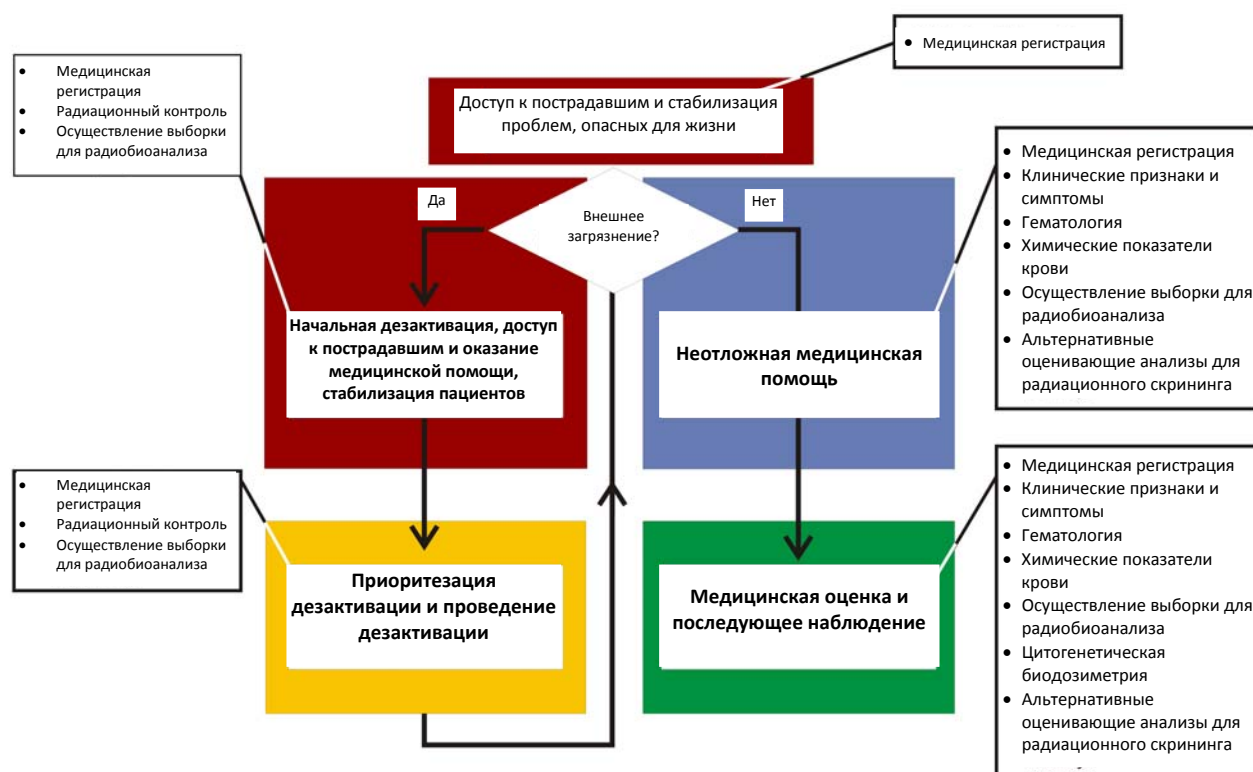


РИС. 47. Концепция действий для биологической дозиметрии при управлении радиационной чрезвычайной ситуацией с присутствием травм или заболеваний. Функции биологической дозиметрии проиллюстрированы для отдельных действий алгоритма REAC/TS и AFRRI «Оказание помощи облученному пациенту» [329].

Нынешние методы оценки радиационного облучения и появляющиеся новые технологии могут создать потенциал совершенствования реагирования на лучевые поражения и оценок дозы. Необходимо проведение научных исследований и разработок для создания концепции диагностической сортировки, с тем чтобы задействовать функциональную концепцию действий биологической дозиметрии при радиационной чрезвычайной ситуации с большим числом пострадавших [329]. Начальный радиационный анализ с целью скрининга должен быть быстрым (1 анализ в минуту или короче), с использованием переносного устройства, и идеально было бы самотестирование. Для второго и третьего радиационного анализа может потребоваться больший экспертный опыт и больше времени (свыше 1 дня), но он будет более радиационно-специфичным.

После того, как пациенты были идентифицированы как потенциально облученные, им можно рекомендовать проведение биологической дозиметрии для подтверждения подозреваемого облучения и определения уровня дозы. На раннем этапе реагирования на радиационную чрезвычайную ситуацию начальная цель цитогенетической сортировки состоит в оперативной оценке дозы для каждого направленного пациента, с тем чтобы дополнить эту раннюю клиническую оценку. Хотя эти первые оценки дозы могут оказаться не очень точными, задача состоит в том, чтобы быстро поместить пациента в один из 4 диапазонов дозы (от 1 до 2 Гр, от 2 до 4 Гр, от 4 до 6 Гр и > 6 Гр) с целью предоставления медицинским работникам своевременной информации, которую можно использовать для оказания медицинской помощи [4]. На данном этапе также возможно опровергнуть ложно положительные пробы, обусловленные такими симптомами, как рвота по другим причинам. На данном этапе можно также выявить частичное облучение тела.

Как только начальные требования выполнения оперативной дозиметрии для проведения сортировки становятся менее настоятельными, те пациенты, которые были идентифицированы как получившие значительные дозы, могут пройти дальнейший анализ для получения более точных оценок дозы.

По завершении чрезвычайной ситуации и получении более точных дозиметрических данных для лиц, идентифицированных как облученные, продолжается наблюдение за теми лицами, которые получили очень низкие или нулевые дозы, но им все еще требуются дальнейшие заверения. Кроме того, потребуются последующие эпидемиологические исследования с использованием других методов, таких как FISH.

#### **14.3.3. Связь с медицинским сообществом**

Чрезвычайно важно наличие связи между медицинским сообществом и лабораториями биологической дозиметрии. При этом необходимо должным образом учитывать вопросы медицинской конфиденциальности [3, 4]. Любая информация от медицинского сообщества, которая может помочь биодозиметристам приоритезировать полученные пробы, чрезвычайно полезна. В равной мере важна своевременная обратная связь между лабораторией биологической дозиметрии и медицинским сообществом, которая поможет медицинским специалистам принять решение об оказании соответствующей медицинской помощи пациентам. Это требование непрерывной коммуникации подчеркивает важность устойчивого отслеживания проб во время принятия ответных мер на событие. Обязательно наличие уникальной, надежной, документированной системы кодирования проб (например, система LIMS, описанная в Разделе 13.3), с тем чтобы пробы можно было отслеживать по всем этапам: взятие крови, обработка, анализ и сообщение результатов медицинскому сообществу. Цитогенетические лаборатории работают со слепыми образцами, а медицинские специалисты работают с именами. Лаборатории необходимо определить тех лиц, которые будут иметь доступ к информации из системы LIMS или из подобных документов, чтобы сообщать ее медицинским специалистам. Эти лица должны будут расшифровывать код для общения с врачами, и поэтому, вероятно, их не следует привлекать к подсчету проб.

### **14.4. СУЩЕСТВУЮЩИЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ СОБЫТИЙ С БОЛЬШИМ ЧИСЛОМ ПОСТРАДАВШИХ**

#### **14.4.1. Подсчет для проведения сортировки**

Оперативный подсчет для проведения сортировки может быть применен к нескольким цитогенетическим анализам, используемых для биологической дозиметрии. Определено, что подсчет 50 клеток (или 30 дицентриков) при анализе дицентриков обеспечивает достаточную точность оценки доз для использования медицинскими специалистами. Было показано, что этот метод подсчета дает оценку дозы в пределах 1 Гр [332, 333]. По сравнению с полным подсчетом дицентриков – 500 или 1000 клеток – этот метод сортировки обеспечивает повышение производительности до 20 раз. Для еще большего увеличения скорости подсчета Флегал и др. внедрили метод QuickScan, при котором в каждой клетке подсчитываются только повреждения и не требуется обеспечить присутствие 46 центромер, однако, при этом подсчитываются лишь те клетки, которые выглядят полными. Этот метод подсчета уменьшает время микроскопии дополнительно в 6 раз [334].

При событиях с большим числом пострадавших, для облучений с высоким уровнем дозы особенно полезен метод преждевременно конденсированных хромосом (РСС). Метод РСС для колец хорошо зарекомендовал себя для дозиметрии с целью сортировки с дозами выше 6 Гр, где измерялось 300 РСС-клеток или 50 колец [335]. Однако у этого анализа имеются ограничения в области низких доз.

Для подсчета с целью сортировки можно также использовать микроядерный тест с блокированием цитокинеза (CBMN). Для стандартной биологической дозиметрии рекомендуется подсчитывать 1000 двухъядерных клеток. Однако недавно было продемонстрировано, что подсчет 200 двухъядерных клеток позволил идентифицировать дозы выше 1 Гр [335]. Время, необходимое для подсчета 200 двухъядерных клеток, составляет приблизительно 15 минут, что значительно короче, чем подсчет дицентриков для сортировки и даже чуть быстрее, чем QuickScan. Другое преимущество данного метода состоит в том, что для подсчета требуется намного меньший экспертный опыт и обучение, чем для анализа дицентриков, поэтому счетчиков можно быстро обучить в ситуации с большим числом пострадавших.

#### **14.4.2. Автоматизация**

Вопросы автоматизации были подробно рассмотрены в Разделе 13. Совершенно очевидно, что автоматизация увеличивает производительность и высвобождает людские ресурсы для других задач, решение которых требуется во время событий с большим числом пострадавших. Автоматизация может включать автоматизацию обработки крови, сбора метафаз, поиска метафаз и подсчета микроядра или дицентриков.

#### **14.4.3. Сети**

Во многих странах созданы экспертные референс-лаборатории цитогенетической биологической дозиметрии. Недавно некоторые из этих лабораторий создали национальные и региональные сети, чтобы увеличить свои возможности [118, 337, 338]. Другие лаборатории проанализировали отдельные национальные ресурсы и возможности с целью формирования региональной сети [339]. Агентства Организации Объединенных Наций (МАГАТЭ, ВОЗ), обеспечивающие международное сотрудничество в области биологической дозиметрии, также создали цитогенетические сети [340, 341] (Таблица 18). Лишь в очень немногих странах имеется больше одной цитогенетической лаборатории, основной функцией которой является биологическая дозиметрия. Однако большой экспертный опыт по цитогенетике может быть накоплен в научно-исследовательских институтах и особенно в отделениях клинической генетики больниц. Национальные сети (например, Франция, Корея, Япония, Канада), осуществили ряд мер, включая обучение, благодаря чему этот экспертный опыт можно быстро мобилизовать под руководством специализированной референс-лаборатории биологической дозиметрии. Организация сети, как национальной, так и международной, требует координации инфраструктуры логистики, управления данными и связи. Эти сети являются также превосходной платформой для тренировок и исследований с целью взаимного сравнения, с тем чтобы обеспечить надлежащие показатели работы отдельных лабораторий и сетей цитогенетической биологической дозиметрии. Использование цитогенетических сетей увеличивает возможности сортировки и оценки референтной дозы методами цитогенетического анализа для радиационных событий с большим числом пострадавших.

ТАБЛИЦА 18. ПЕРЕЧЕНЬ СУЩЕСТВУЮЩИХ СЕТЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ

|                    | Место-<br>нахождение | Наименование  | Руководитель  | Участники<br>(число или имя)                                   | <sup>2</sup> Используемые виды анализа |
|--------------------|----------------------|---|---|--|--|
| Между-<br>народные | Глобальная           | Сеть реагирования<br>и помощи<br>(RANET)                    | МАГАТЭ  | В процессе<br>изменения <sup>4</sup>                           | DCA, FISH, PCC, CBMN                   |
|                    | Глобальная           | BioDoseNet  | ВОЗ   | 63   | DCA, FISH, PCC, CBMN                   |
|                    | Европа               | Tri-Partite   | В зависимости<br>от места события   | <sup>3</sup> Великобритания, Франция,<br>Германия              | DCA, FISH, PCC, CBMN                   |
|                    | Латинская Америка    | Латино-<br>американская сеть<br>биологической<br>дозиметрии | <sup>1</sup> Аргентина – Управление по<br>ядерному регулированию<br>и Куба – Центр радиационной<br>защиты и гигиены | Аргентина (2), Бразилия, Чили,<br>Куба, Мексика, Перу, Уругвай | <sup>2</sup> DCA, FISH, CBMN           |
| Националь-<br>ные  | Канада               | Чрезвычайная<br>цитогенетическая<br>сеть                    | Министерство здравоохранения<br>Канады  | 4 референс - лаборатории<br>18 спутников                       | DCA, FISH, CBMN                        |
|                    | Франция              | Сеть биологичес-<br>кой дозиметрии                          | Институт радиационной защиты и<br>ядерной безопасности (IRSN)   | 2 лаборатории CEA и одна<br>лаборатория MNHN                   | DCA, FISH, PCC                         |
|                    | Япония               | Сеть Хромосома  | Национальный Институт<br>радиологических наук (NIRS)  | 7  | DCA, PCC, FISH                         |
|                    | Южная Корея          | Корейская сеть<br>радиационной<br>биодозиметрии             | Корейский институт<br>радиологических и медицинских<br>наук   | 6  | DCA, FISH, PCC, CBMN                   |

<sup>1</sup> С ротацией руководства стран-участников каждые 2 года.<sup>2</sup> DCA является методом, используемым в рамках сотрудничества; PCC, FISH и CBMN имеются по крайней мере у некоторых партнеров по сети.<sup>3</sup> Совместное руководство.<sup>4</sup> Часть более широкой сети помощи и реагирования.



## 15. ПРОГРАММЫ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТЫ ISO

### 15.1. ОБОСНОВАНИЕ ПРОГРАММЫ ГАРАНТИИ КАЧЕСТВА И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

В настоящей публикации было продемонстрировано отсутствие каких-либо универсально принятых процедур для цитогенетических анализов, используемых в биологической дозиметрии. В общем плане лаборатории используют схожие методы, но когда речь идет о мелких деталях, в методах возникают некоторые изменения, которые потенциально могут влиять на качество результатов. Поэтому обоснованно ожидать, что каждая сервисная лаборатория разработает программу качества, гарантирующую надежность, точность и воспроизводимость своих процедур.

Для гарантии качества работы лаборатории биологической дозиметрии в течение длительных периодов времени ее производственный процесс должен прочно опираться на научные принципы, валидацию методов и верификацию продукта. Наличие полноценной программы качества обеспечивает стратегию гарантии качества продукта лаборатории, будь то проведение измерений или предоставление услуг. Кроме того, необходимо периодически сравнивать свои возможности с возможностями других сертифицированных или надлежащим образом аттестованных лабораторий цитогенетической биологической дозиметрии, обеспечивать постоянную стабильность лабораторного процесса, и периодически оценивать конечный продукт для подтверждения соответствия заданным характеристикам.

Работа в рамках документально оформленных критериев и с соблюдением требований внутренней программы обеспечения качества, периодические партнерские проверки и документально оформленные процедуры обеспечения качества гарантируют стабильную работу между формальными проверками профессионального мастерства.

Внутренняя программа обеспечения качества должна предусматривать оценку программы работ, надлежащую рабочую среду, квалификацию персонала, руководство по процедурам, наличие приборной базы, калибровку, уплотнение данных, систему ведения записей и предоставление данных. Контроль над цитогенетическим процессом между проверками профессионального мастерства обеспечивает еще одну гарантию конечных продуктов с воспроизводимым качеством. Принятие комплексной программы управления качеством может обеспечить непрерывное совершенствование выполняемой деятельности.

При проведении проверок профессионального мастерства периодически оценивают соответствие проводимых измерений показателям других сертифицированных или надлежащим образом аттестованных лабораторий цитогенетической биологической дозиметрии, (см. Приложение VII) и проверяют лабораторию и ее возможности производить высококачественные продукты и/или услуги, то есть оценку доз. Существенным элементом является успешное выполнение анализов в указанных пределах точности. Кроме того, этот процесс измерений может быть использован для проверки качества продуктов/услуг лаборатории. Для определенной области биологической дозиметрии могут использоваться две стратегии тестирования профессионального мастерства измерений: 1) образцы, подвергнутые облучению *in vitro* с известной дозой, мощностью дозы и качеством излучения, посылают в сервисную лабораторию для анализа, и 2) лаборатория участвует в межлабораторном сравнительном исследовании образцов, направленных на анализ в сертифицированные или надлежащим образом аттестованные лаборатории. В обоих случаях выполняются анализы и сравниваются

значения, полученные проверяемой лабораторией и проверяющей лабораторией. Далее в лабораторию направляют отчет с уведомлением о процентном различии результатов. С другой стороны, когда лаборатория выполняет количественный анализ своего собственного продукта, и также посылает аликвоту в проверяющую лабораторию для подтверждающих измерений и на прямую прослеживаемость измерений, то при этом проверяются как аналитические процессы лаборатории, так и ее возможности проведения измерений.

Благодаря объединению всех этих стратегий обеспечения качества можно гарантировать качество и целостность измерений или услуг лаборатории. Основной упор среди этих стратегий должен быть сделан на сильные внутренние программы обеспечения качества, активные и всесторонние внутренние экспертные оценки, строгую приверженность документально оформленным операционным критериям, и оценке лаборатории методом «слепого» контроля. Эта комбинация проверок гарантирует, что аналитические процессы останутся под контролем в пределах заданных показателей точности. Хотя периодическая оценка конечного продукта является обязательным требованием (например, между первым и третьим годами), ее частота может быть минимальной, когда аналитические процессы остаются под контролем.

Планы обеспечения качества для сервисных лабораторий, выполняющих биологическую дозиметрию, должны включать следующие элементы:

- идентификация и подготовка образцов
- валидация процедур или методов
- проведение измерений
- сжатие данных
- документальное оформление

В плане обеспечения качества должны быть предусмотрены систематические действия для обеспечения достаточной уверенности в том, что измерение или процедура выполняются надлежащим образом.

Международная организация по стандартизации (ISO) оказалась соответствующей структурой, способной дать определение и разработать такой набор общих правил. Общими принципами, которыми руководствуется ISO при разработке стандартов, являются добровольность, консенсус и отраслевая направленность. Кроме того, каждый проект стандарта проходит экспертную оценку в рабочей группе специалистов, далее с ними работают страны-члены ISO через национальных представителей в ISO. Любой стандарт после публикации можно использовать непосредственно или преобразовать его в национальные стандарты. Создание рабочей группы по стандартизации биологической дозиметрии было предложено в 1998 г. и принято ISO в 1999 г. в рамках Технического комитета 85, Ядерная энергия, на уровне Подкомитета 2, Радиационная защита. Рабочая группа включает 13 специалистов из 11 стран плюс представитель МАГАТЭ. Стандарт ISO 19238, опубликованный в 2004 г., называется «Критерии эффективности функционирования специализированных лабораторий, выполняющих биологическую дозиметрию посредством цитогенетики» [3].

## 15.2. СОВРЕМЕННАЯ СТРУКТУРА ДОКУМЕНТА ISO 19238 [3]

Документ в его текущем формате разделен на 11 глав и 4 информационных приложения.



Главные особенности документа представлены в его описании:

- a) Конфиденциальность личной информации относительно следующего:
  - i) Передача конфиденциальных данных относительно пациента или обстоятельств переоблучения, от врача, представляющего пациента (или непосредственно от пациента) в лабораторию.
  - ii) Анонимность образца крови и конфиденциальность результатов и отчета.
  - iii) Делегирование конфиденциальности в лаборатории.
- b) Потенциальные риски, которым подвергается персонал лаборатории во время обработки потенциально зараженного образца крови. Хотя эта проблема не является специфичной для биологической дозиметрии как таковой, представляется важным подчеркнуть минимальные требования микробиологической, химической и оптической безопасности.
- c) Создание по крайней мере одной соответствующей калибровочной кривой в сервисной лаборатории является одним из важнейших условий для оценки дозы. В частности, при получении этой кривой должны использоваться те же самые лабораторные протоколы, которые используются данной лабораторией для всех ее оценок дозы. Отчет должен включать в себя экспериментальные условия построения калибровочной кривой, например, природу источника и физическую калибровку источника, диапазоны значений дозы и минимальные уровни обнаружения.
- d) Несмотря на то, что сервисная лаборатория не может контролировать некоторые условия, такие как качество взятого образца крови и его перевозки, она должна после получения образца обеспечить его нормальную обработку, оценку дозы и, наконец, составление отчета, который рассматривается и утверждается квалифицированным экспертом.
- e) Как правило, в лабораторном отчете должна быть воспроизведена любая релевантная информация, предоставленная клиентом, поскольку это может повлиять на интерпретацию результатов. Все наблюдаемые аберрации должны быть перечислены и интерпретированы в соответствии с текущим пониманием механизмов образования радиационно-индуцированных хромосомных аберраций.
- f) Планы обеспечения качества для сервисных лабораторий должны включить внутренние процедуры, чтобы гарантировать долгосрочную точность и стабильность показателей, а также периодическую взаимную оценку/взаимную калибровку по внешней референсной программе. Это относится к следующим составляющим в широком плане: идентификация и подготовка образцов, валидация процедур или методов, измерения и приборы, интерпретация данных, хранение и документальное оформление записей.

### 15.3. ПРИМЕНЕНИЕ СТАНДАРТА ISO ДЛЯ СОРТИРОВКИ НАСЕЛЕНИЯ

Как уже рассматривалось в Разделе 14, всегда присутствует вероятность ядерных и радиологических чрезвычайных ситуаций с большим числом пострадавших от аварий или злонамеренных действий. После такого события люди будут проходить клиническое обследование, и им будет присваиваться категория на основе любых продромальных признаков и симптомов переоблучения, а также имеющейся информации относительно их задействованности в чрезвычайной ситуации. На этом раннем этапе реагирования на радиационную чрезвычайную ситуацию целесообразно также проведение цитогенетической сортировки, то есть использование хромосомных повреждений для приблизительной и быстрой оценки радиационных доз, полученных людьми, как дополнительной меры ранней клинической классификации пострадавших.

Однако со временем клиницисты запросят более точные оценки доз, как в диапазоне низких доз с риском стохастических эффектов в будущем, так и более высоких доз, где можно ожидать серьезные реакции тканей. Вторичное цитогенетическое обследование должно дать количественно более точную оценку дозы, и также попытаться найти любые доказательства неравномерности облучения.

Однако при таком событии ресурсов местной задействованной биологической дозиметрической лаборатории может оказаться недостаточно, и потребуются привлечение других лабораторий в рамках созданной сети (см. Раздел 14.5.3). Несколько биологических дозиметрических лабораторий независимо и успешно выполнили быструю оценку дозы в чрезвычайных ситуациях с большим числом пострадавших или при проведении учений. Их подход был в принципе основан на количественном анализе дицентриков и включал предварительное планирование, создание запаса реактивов, упрощенную обработку образцов, автоматизацию, выработку критериев подсчета и организацию сети с другими экспертными лабораториями. Хотя положения ISO 19238 соблюдались [3], оказались необходимы некоторые отклонения от точного протокола для удовлетворения требования быстрого реагирования и быстрой выдачи полученной оценки дозы.

Исходя из этого опыта, был разработан новый Стандарт ISO 21243 «Критерии эффективности функционирования лабораторий, выполняющих установление очередности медицинской помощи с использованием цитогенетических методов для оценки массовых потерь в случае радиационной аварийной ситуации или ядерной аварии. Общие принципы и применение для дицентрического исследования» [4], который был опубликован в 2008 г.

Стандарт написан в форме процедур, которые должны быть приняты для биологической дозиметрической сортировки, где критерии, требуемые для таких измерений, обычно будут зависеть от применения результатов: ведение пациентов в соответствующих случаях, управление радиационной защитой, хранение документов и медицинские/правовые требования. Например, отдельные случаи могут быть проанализированы для более точной оценки высокого частичного облучения тела; во-вторых, дозы могут быть оценены для людей, облученных ниже порогового значения на предмет детерминированных эффектов, руководствуясь критериями ISO 19238.

Содержание стандарта ISO 21243 можно кратко изложить следующим образом:

**1) До события каждая лаборатория ответственна за:**

- a) Поддержание запаса необходимых реактивов и других лабораторных расходных материалов или наличие немедленного доступа к ним из местного, регионального или национального запаса или от коммерческого поставщика.
- b) Поддержание установленных линий связи с местными/региональными/федеральными учреждениями здравоохранения.
- c) Определение и документальное оформление обязанностей, ролей и взаимосвязей всех сотрудников лаборатории, функции которых влияют на качество биологического дозиметрического реагирования в чрезвычайной ситуации.
- d) Знание максимальной производительности лаборатории в отношении обработки проб (продолжительность времени в зависимости от числа проб).
- e) Поддержание собственного контроля качества и программы обеспечения качества.
- f) Участие, по мере необходимости, в соответствующих образовательных, учебных и тренировочных программах.
- g) Участие в периодических межлабораторных сравнительных исследованиях.

## **2) Во время события:**

- a) Референс-лаборатория, ответственная за оценку дозы, обращается с предложением о совместной работе к сетевым лабораториям, когда число случаев, подлежащих исследованию, превышает ее возможности.
- b) После принятия решения задействовать сеть референс-лаборатория становится центром для связи внутри сети. Референс-лаборатория сообщает партнерам обстоятельств инцидента, и они вместе устанавливают степень необходимого сотрудничества.
- c) Цитогенетическое исследование для оценки дозы выполняется по запросу врачей. Случаи, подлежащие этому исследованию, выбираются путем обсуждения между экспертами по цитогенетической оценке дозы, лицами, руководящими на месте события, и врачами.
- d) Референс-лаборатория и лаборатории сети обсуждают детали разделения работ по биологической дозиметрии.
- e) Каждый человек или лечащий врач, в зависимости от ситуации, должен представить информированное согласие в письменной форме до взятия крови. Необходимо принять особые меры к защите частной информации в течение всех работ.
- f) Референс-лаборатория организует забор крови и отправку проб партнерам, или определяет другое подходящее ведомство, которому передать дела.
- g) Результаты подсчета (и иногда оценки дозы) рассматриваются более чем одной лабораторией, и оценка дозы для каждого человека делается на основании рассмотренных результатов.
- h) Лаборатории-партнеры посылают в референс-лабораторию исходные данные, включая данные о распределении аберраций. Они также посылают оценки дозы, откорректированные, при необходимости, для растянутых или неравномерных доз, которые получены из их собственной калибровочной кривой, наиболее подходящей для данного вида излучения.
- i) Референс-лаборатория получает результаты партнеров по сети и действует как центральный пункт коммуникации/связи с врачами.
- j) После получения отзыва от медицинских специалистов некоторые пациенты могут быть отобраны для расширенного подсчета клеток, с тем чтобы снизить статистическую неопределенность в оценках дозы и лучше различить неравномерное переоблучение. Такое дальнейшее исследование выполняется в соответствии с критериями эффективности, описанными в стандарте ISO 19238.

Согласно этим различным конфигурациям, блок-схема (Рис. 48) описывает взаимодействия между референс-лабораторией, сетью и группой медицинских специалистов.

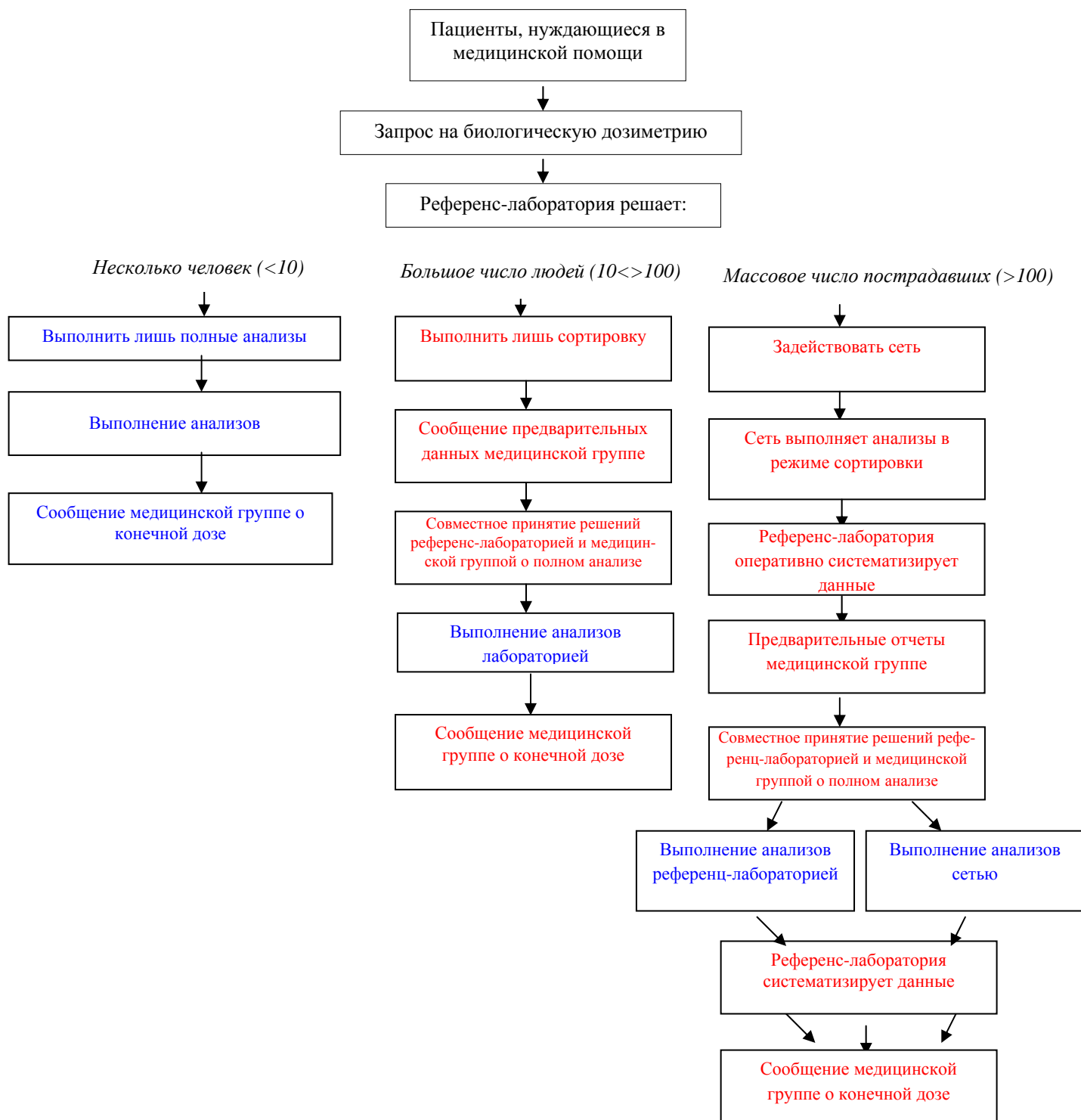


РИС. 48. Блок-схема, описывающая взаимодействие между биологической дозиметрической референс-лабораторией, сетью и медицинской группой в контексте оценки дозы нескольких человек (стандарт ISO 19238 (синий) [3]) или массового числа пострадавших (стандарт ISO 21243 (красный) [4]). (Эта схема воспроизведена из стандарта ISO 21243:2008 с разрешения AFNOR от имени ISO. Авторское право остается за ISO).

## 16. БЕЗОПАСНОСТЬ ПЕРСОНАЛА ЛАБОРАТОРИИ

«Биобезопасность лаборатории» – это термин, используемый для описания принципов изоляции, технологий и методов, которые реализуются для предотвращения непреднамеренного контакта с патогенами и токсинами, или их случайного выброса. Глобальные события недавнего прошлого выдвинули на первый план потребность защитить лаборатории и находящиеся в них материалы, чтобы не допустить возникновения преднамеренной опасности, в результате которой могут пострадать люди, домашний скот, сельское хозяйство или окружающая среда. Отсюда возникла необходимость расширения биобезопасности через введение мер биозащиты лабораторий.

Термин «биозащита лабораторий» описывает защиту, контроль и учет ценных биологических материалов в лабораториях для предотвращения несанкционированного доступа, утери, хищения, ненадлежащего употребления, отклонения от заявленного использования или преднамеренного выпуска во внешнюю среду [355].

Применительно к цитогенетическим лабораториям, биобезопасность и биозащита всесторонне представлены в WHO Laboratory Biosafety Manual («Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях») и в сопровождающем документе «Управление биорисками. Руководство по биозащите лабораторий»: проект лабораторных зданий и помещений, оборудование (т.е. боксы биологической безопасности), безопасное производство работ, гигиена труда и медицинское наблюдение, дезинфекция и стерилизация, обработка отходов, воздействие химических соединений, пожарная, электротехническая, радиационная безопасность и безопасность оборудования. Эта информация полностью применима и чрезвычайно полезна для работы цитогенетической лаборатории [355, 356].

В дополнение к указанным руководствам, сотрудники лабораторий должны соблюдать требования национального и ведомственного законодательства или нормативных документов, относящихся к безопасной и защищенной работе в лабораториях.

Ниже рассматриваются некоторые показатели безопасности в цитогенетических лабораториях, на которые следует обратить особое внимание.

### 16.1. ИНФЕКЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

При работе с кровью человека всегда должны применяться универсальные меры предосторожности, и все пробы крови должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал. Распаковка проб и манипуляция с пробами должны осуществляться в соответствующем образом используемых, обслуживаемых и сертифицированных боксах биологической безопасности.

Использование острых предметов, например, шприцев для подкожных инъекций, должно быть ограничено, чтобы уменьшить риск травм от укола иглой. Загрязненные острые предметы всегда должны собираться в проколостойкие контейнеры, снабженные крышками, и рассматриваться как потенциально инфекционный материал. Для ликвидации разливов и деконтаминации рабочих поверхностей и оборудования после обработки проб необходимо иметь соответствующие дезинфицирующие средства. Все биологические отходы и использованная одноразовая пластиковая посуда перед удалением должны стерилизоваться, например, путем автоклавирования. При удалении из лабораторий инфекционных отходов для деконтаминации и утилизации они должны

транспортироваться в опечатанных герметичных контейнерах в соответствии с требованиями национальных и/или международных нормативных документов, в установленном порядке [356].

После получения соответствующей оценки риска возможного контакта и клинической оценки состояния здоровья человека ему следует предложить конкретную вакцину или токсин, лицензированные и доступные на местном уровне [356].

## 16.2. ОПТИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Для определенных процедур может потребоваться использование ультрафиолетового света (УФ).

В боксах биологической безопасности ультрафиолетовые лампы не требуются. Если они используются, их необходимо часто очищать, поскольку любая пыль и грязь снижает бактерицидную эффективность ультрафиолетового света. Там, где ультрафиолетовые лампы используются, они должны быть выключены при нахождении людей в данном помещении для защиты глаз и кожи от случайного облучения [356].

Когда УФ-лампы используются для облучения препаратов во время процедуры окрашивания ФПП, необходимо предусмотреть экранирование и наличие соответствующих рабочих процедур для предотвращения прямого попадания света на кожу или в глаза персонала лаборатории.

Конструкция флюоресцентных микроскопов, как правило, такова, что при нормальной эксплуатации в них действует принцип внутренне присущей безопасности.

## 16.3. ХИМИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Определенные чистые реактивы и фармацевтические препараты регулярно используются в процедурах, рассматриваемых в настоящей публикации. Дополнительную информацию об опасных химических соединениях и химической безопасности см. в «Практическом руководстве по биологической безопасности в лабораторных условиях», часть IX [356, часть IX] с полным перечнем химических соединений, детальным описанием их опасных факторов и необходимых мер предосторожности.

Когда химические соединения и фармацевтические препараты присутствуют в культурах или используются в процедурах окрашивания, по большей части они используются в небольших объемах и в разбавленном виде, и в этом случае, как правило, не представляют опасности для здоровья человека. Однако их готовят и хранят в виде концентрированных основных растворов. Основные реактивы, вызывающие озабоченность, и относящиеся к ним фразы риска (номера R), согласованные на международном уровне, перечислены в Таблице 19.

Хранение химических соединений в лабораториях должно быть ограничено количеством, необходимым для ежедневного использования. Их основная масса должна храниться в специально для этого предназначенных помещениях или зданиях.

Не допускается хранение химических соединений в алфавитном порядке! [356]

ТАБЛИЦА 19. ОСНОВНЫЕ РЕАКТИВЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ОЗАБОЧЕННОСТЬ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ, И ОТНОСЯЩИЕСЯ К НИМ ФРАЗЫ РИСКА, СОГЛАСОВАННЫЕ НА МЕЖДУНАРОДНОМ УРОВНЕ

| Реактив                                      | Фраза риска (номер R <sup>a</sup> ) |
|--|-------------------------------------|
| Уксусная кислота                             | 10; 25                              |
| Оранжевый акридин                            | 36; 37; 38                          |
| Гидроокись бария                             | 20; 22; 34                          |
| Бензилпенициллин                             | 42; 43                              |
| Бромдеоксиуридин                             | 20; 21; 22; 46; 61                  |
| Каликулин А                                  | 23; 24; 25; 38                      |
| Колцеид                                      | 25; 63                              |
| Цитохалазин В                                | 26; 27; 28; 63                      |
| Краситель ДАПИ (4', 6-диамидин-2-фенилиндол) | 36; 37; 38                          |
| ДМСО (Диметилсульфоксид)                     | 36; 37; 38                          |
| Формальдегид                                 | 23; 24; 25; 34; 40; 43              |
| Формаид                                      | 37; 38; 41; 61                      |
| Краситель Гимза                              | 20; 21; 22; 40; 41                  |
| Гепарин                                      | 36; 37; 38                          |
| Краситель Хехста                             | 23; 24; 25; 36; 37; 38              |
| Соляная кислота                              | 34; 37                              |
| Гипак  | 42; 43                              |
| Метанол                                      | 11; 23; 24; 25; 39                  |
| Окадаиновая кислота                          | 23; 24; 25; 38                      |
| Пепсин                                       | 36; 37; 38; 42                      |
| Фитогемагглютинин                            | 20; 21; 22; 43                      |
| Рибонуклеаза А                               | 20; 21; 22; 38                      |
| Гидроокись натрия                            | 35                                  |
| Стрептомицина сульфат                        | 20; 21; 22; 61                      |
| Ксилол                                       | 10; 20; 21; 38                      |

R 10: огнеопасно  
R 11: очень огнеопасно  
R 20: опасно при вдыхании  
R 21: опасно при попадании на кожу  
R 22: опасно при проглатывании  
R 23: токсично при вдыхании  
R 24: токсично при попадании на кожу  
R 25: токсично при проглатывании  
R 26: очень токсично при вдыхании  
R 27: очень токсично при попадании на кожу  
R 28: очень токсично при проглатывании  
R 34: вызывает ожоги  
R 35: вызывает тяжелые ожоги  
R 36: вызывает раздражение глаз  
R 37: вызывает раздражение органов дыхания  
R 38: вызывает раздражение кожи  
R 39: риск очень серьезных необратимых эффектов  
R 40: ограниченные данные о канцерогенном эффекте  
R 41: риск серьезного повреждения глаз  
R 42: может вызвать сенсибилизацию при вдыхании  
R 43: может вызвать сенсибилизацию при попадании на кожу  
R 46: может вызвать наследственные генетические нарушения  
R 61: может причинить вред эмбриону  
R 63: возможен риск причинения вреда эмбриону



## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, Technical Reports Series No. 260, IAEA, Vienna (1986).
- [2] TURAI, I., The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998–2000, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1113–1116.
- [3] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Service Laboratories Performing Biological Dosimetry by Cytogenetics, ISO 19238, ISO, Geneva (2004).
- [4] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Laboratories Performing Cytogenetic Triage for Assessment of Mass Casualties in Radiological or Nuclear Emergencies-General Principles and Application to Dicentric Assay, ISO 21243, ISO, Geneva (2008).
- [5] FENECH, M., et al., HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [6] ROJAS-PALMA, C., et al. (Eds) TMT Handbook, Triage, Monitoring and Treatment of People Exposed to Ionizing Radiation Following a Malevolent Act, Lobo Media AS, Norway (2009).
- [7] BERTHO, J.M., et al., New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat. Res.* **169** (2008). 543–550
- [8] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual, Technical Reports Series No. 405, IAEA, Vienna (2001).
- [9] HUBBLE, J.H., Photon mass attenuation and energy — Absorption coefficients from 1 keV to 20 MeV, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33** (1982) 1269–1290.
- [10] GRAY, L.H., An ionization method for the absolute measurement of gamma-ray energy, *Proc. Soc. Lond.*, **A156** (1936) 578–596.
- [11] DENG, W., MORRISON, D.P., GALE, K.L., LUCAS, J.N., Biological dosimetry of beta-ray exposure from tritium using chromosome translocations in human lymphocytes analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* **150** (1998) 400–405.
- [12] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS, Quantities and Units in Radiation Protection Dosimetry, ICRU Rep. **51** (1993).
- [13] STRAUME, T., High-energy gamma rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for risk and  $W_R$ , *Health Phys.* **69** (1995) 954–956.
- [14] SCHMID, E., BAUCHINGER, M., LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for risk assessments, *Health Phys.* **74** (1998) 719–721.
- [15] МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ, ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, Общие процедуры медицинского реагирования при ядерной или радиологической аварийной ситуации, EPR-MEDICAL, МАГАТЭ, Вена (2009).
- [16] LEA, D.E., Actions of Radiation on Living Cells, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1956).
- [17] GOODHEAD, D.T., The initial physical damage produced by ionizing radiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **56** (1989) 623–634.
- [18] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., “Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality. A resume including recent results using alpha particles”, *Microdosimetry* (Proc. 7th Symp. Harwood Academic, Oxford, 1980), Vol. 2 (BOOZ, J., EBERT, H.G., HARTFIEL, H.D., Eds), Harwood Academic Publishers, Brussels and Luxembourg (1981) 1263–1273.

- [19] МЕЖДУНАРОДНАЯ КОМИССИЯ ПО РАДИАЦИОННОЙ ЗАЩИТЕ, Рекомендации 2007 года Международной комиссии по радиационной защите, (Публикация 103). Труды МКРЗ, Москва (2009).
- [20] NOWELL, P.C., Phytohemagglutinin – An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* **20** (1960) 462–466.
- [21] CARSTAIRS, K., The human small lymphocyte – its possible pluripotential quality, *Lancet* (1962) 829–832.
- [22] WUESTERMANN, P.R., CRONKITE, E.P., Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes, *Stem Cells* **13** Suppl. 1 (1995) S268–S275.
- [23] CHENG, C. K-W., CHAN, J., CEMBROWSKI, G.S., VAN ASSENDELFT, O.W., Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: Stratification by age, sex, and race, *Lab. Haematol.* **10** (2004) 42–53.
- [24] DAINIAK, N., WASELENKO, J.K., ARMITAGE, J.O., MacVITTEE, T.J., FARESE, A.M., The hematologist and radiation casualties, *Hematology*, **2003** (2003) 473–496.
- [25] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries, Safety Report Series No. 2, IAEA, Vienna (1998).
- [26] McLEAN, A.R., MICHIE, C.A., In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (1995) 3707–3711.
- [27] BOGEN, K.T., Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 195–204.
- [28] OBE, G., BEEK, B., DUDIN, G., The human leukocyte test system: V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures, *Humangenetik* **28** (1975) 295–302.
- [29] PAULSON, J.R., LAEMMLI, U.K., The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* **12** (1977) 817–828.
- [30] CREMER, C., et al., Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 97–116.
- [31] SCHAFFER, L.G., TOMMERUP, N. (Eds), Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN, Karger, Basel (2005).
- [32] MORTON, N.E., Parameters of the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** (1991) 7474–7476.
- [33] CARRANO, A.V., Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage, *Radiat. Res.* **63** (1975) 403–421.
- [34] MÜLLER, H.J., Artificial transmutation of the gene, *Science* **66** (1927) 84–87.
- [35] PAINTER, T.S., MÜLLER, H.J., Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*, *J. Hered.* **20** (1929) 287–298.
- [36] SAX, K., Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9** (1941) 93–103.
- [37] REVELL, S.H., “A new hypothesis for chromatid exchanges”, *Radiobiology* (Proc. Symp. Liège, 1954), Butterworths, London (1955) 243–253.
- [38] CHADWICK, K.H., LEENHOUTS, H.P., The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements, *Int. J. Radiat. Biol.* **33** (1978) 517–529.
- [39] MOZUMDER, A., MAGEE J.L., Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat Res.* **28** (1966) 203–14.
- [40] GEORGAKILAS, A.G., Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. BioSyst.*, **4** (2008) 30–35.

- [41] JAEA R&D REVIEW, Dependency of yield of DNA damage refractory to enzymatic repair on ionization and excitation density of radiation – Exploring the induction mechanism of clustered DNA damage, (2007), [http://jolisfukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2007/6\\_5.html](http://jolisfukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2007/6_5.html)
- [42] WARD, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **35** (1988) 95–135.
- [43] RYDBERG, B., Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncol.* **40** (2001) 682–685.
- [44] FORTINI, P., DOGLIOTTI, E., Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long-patch repair subpathways, *DNA Repair* **6** (2007) 398–409.
- [45] CALDECOTT, K.W., Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, *DNA Repair* **6** (2007) 443–453.
- [46] IDE, H., et al., Repair of DNA-protein crosslink damage: Coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52** (2008) 57–58.
- [47] JEGGO, P.A., LÖBRICH, M., Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair* **5** (2006) 1192–1198.
- [48] WYMAN, C., KANAAR, R., Homologous recombination: down to the wire, *Curr. Biol.* **14** (2004) R629–R631.
- [49] HEFFERIN, M.L., TOMKINSON, A.E., Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair* **4** (2005) 639–648.
- [50] ROTHKAMM, K., KRÜGER, I., THOMPSON, L.H., LÖBRICH, M., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [51] SASAKI, M.S., Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics, *Int. J. Radiat. Biol.* **85** (2009) 26–47.
- [52] SAVAGE, J.R.K., Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* **13** (1976) 103–122.
- [53] EVANS, H.J., Chromosome aberrations induced by ionizing radiations, *Int. Rev. Cytol.* **13** (1962) 221–321.
- [54] MESTRES, M., et al., Analysis of alpha-particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 737–744.
- [55] BENKHALED, L., et al., Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 869–875.
- [56] GEBHART, E., Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification in human neoplasia: a review, *Clinical and Translational Oncology* **7** (2005) 477–485.
- [57] BLOOM, A.D., NEEL, J.V., CHOI, K.W., IDA, S., CHAGNON, N., Chromosome aberrations among the Yanomama Indians, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 920–927.
- [58] AWA, A.A., NEEL, J.V., Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 1021–1025.
- [59] SEVAN’KAEV, A.V., et al., Rogue cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 361–367.
- [60] NEEL, J.V., AWA, A.A., KODAMA, Y., NAKANO, M., MABUCHI K., Rogue lymphocytes among Ukrainians not exposed to radioactive fall-out from the Chernobyl accident: the possible role of this phenomenon in oncogenesis, teratogenesis and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6973–6977.

- [61] NEEL, J.V., et al., Hypothesis: “rogue cell”-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncopenesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2690–2695.
- [62] FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEI, J. J., NATARAJAN, A.T., Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 807–813.
- [63] BUCKTON, K.E., SMITH, P.G., COURT BROWN, W.M., “The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis”, *Human Radiation Cytogenetics (Proc. Conf. Edinburgh, 1966)* (EVANS, H.J., COURT BROWN, W.M., McLEAN, A.S., Eds), North-Holland, Amsterdam (1967) 106–114.
- [64] EDWARDS, A.A., et al., Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 396–402.
- [65] DURAN, M., BARQUINERO, J.F., CABALLIN, M.R., RIBAS, M., BARRIOS, L., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture, *Radiat. Res.* **171** (2009) 425–437.
- [66] PANTELAS, G.E., MAILLIE, H.D., A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, *Somat. Cell. Genet.* **9** (1983) 533–547.
- [67] PANTELAS, G.E., MAILLIE, H.D., The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **99** (1984) 140–150.
- [68] KANDA, R., HAYATA, I., LLOYD, D.C., Easy biodosimetry for high-dose radiation exposure using drug-induced, prematurely condensed chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 441–446.
- [69] DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GOTOH, E., A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 457–462.
- [70] VYAS, R.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **249** (1991) 29–35.
- [71] PANTELAS, G.E., MAILLIE, H.D., Direct analysis of radiation induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique, *Mutat. Res.* **149** (1985) 67–72.
- [72] DARROUDI, F., FOMINA, J., MEIJERS, M., NATARAJAN, A.T., Kinetics of formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* **404** (1998) 55–65.
- [73] WALDREN, C.A., JOHNSON, R.T., Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X and UV irradiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 1137–1141.
- [74] GOTOH, E., DURANTE, M., Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools, *J. Cell Physiol.* **209** (2006) 297–304.
- [75] BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., PYLE, M.D., MOSBROOK, D.M., LOATS, A.S., RIPPEON, T.L., LOATS, H., Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder, *Stem Cells Suppl.* **1** (1995) S223–S230.
- [76] PRASANNA, P.G.S., ESCALADA, N.D., BLAKELY, W.F., Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study

- chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry, *Mutat. Res.* **466** (2000) 131–141.
- [77] PRASANNA, P.G.S., BLAKELY, W.F., “Premature chromosome condensation in human resting peripheral blood lymphocytes for chromosome aberration analysis using specific whole-chromosome DNA hybridization probes”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 291 *Methods in Molecular Biology* (KEOHAVONG, P., GRANT, S.G., Eds), Humana Press, Totowa, NJ (2004) 49–57.
  - [78] PATHAK, R., RAMAKUMAR, A., SUBRAMANIAN, U., and PRASANNA, P.G.S., Differential radio-sensitivities of human chromosomes 1 and 2 in interphase- and metaphase–spreads after  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -irradiation in one human donor, *BMC Med. Phys.* **9** (2009) 1–8.
  - [79] PANTELIS, G.E., ILIAKIS, G.E., SAMBANI, C.D., POLITIS, G., Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 349–354.
  - [80] LAMADRID, A.I., GARCIA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., ROY L., PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation, *J. Radiat. Res.* **48** (2007) 1–6.
  - [81] GOTOH, E., TANNO, Y., TAKAKURA, K., Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC), *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 33–40.
  - [82] COUNTRYMAN, P.I., HEDDLE, J.A., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **41** (1976) 321–331.
  - [83] FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* **147** (1985) 29–36.
  - [84] FENECH, J., MORLEY, A.A., Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation, *Mutat. Res.* **161** (1986) 193–198.
  - [85] VRAL, A., THIERENS, H., DE RIDDER, L., *In vitro* micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 61–68.
  - [86] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
  - [87] WILLEMS, P., et al., Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events, *Int. J. Radiat. Biol.* **86** (2010) 2–11.
  - [88] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry, *Health Phys.* **98** (2009) 234–243.
  - [89] THOMAS, P., UMEKAGI, K., FENECH, M., Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis*. **18** (2003) 187–94.
  - [90] TAMURA, H., SUGIYAMA, Y., SUGAHARA, T., Changes in the number of circulating lymphocytes with chromosomal aberrations following a single exposure of the pelvis to  $\gamma$ -irradiation in cancer patients, *Radiat. Res.* **59** (1974) 653–657.
  - [91] BREWEN, L.G., PRESTON, R.J., LITTLEFIELD, L.G., Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays, *Radiat. Res.* **49** (1972) 647–656.
  - [92] GRANATH, F., et al., Retrospective dose estimates in Estonian Chernobyl clean-up workers by means of FISH, *Mutat. Res.* **369** (1996) 7–12.
  - [93] WORLD HEALTH ORGANISATION, Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances, 2009-2010, WHO/HSE/EPR/2008.10, WHO, Geneva (2008).
  - [94] WILKINS, R.C., et al., Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events, *Radiat. Res.* **169** (2008) 551–560.

- [95] FABRY, L., LEMAIRE, M., Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vivo* and *in vitro*, *Strahlentherapie* **162** (1986) 63–67.
- [96] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., CORP, M.J., The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays, *Radiat. Environ. Biophys.* **23** (1984) 179–189.
- [97] MYSKA, J.C., et al., Arrays for Use at the Cobalt Irradiation Facility, TR97-2, Armed Forces Radiobiology Research Institute (1997), <http://www.usuhs.mil/afri/outreach/reports/pdf/TR97-2.pdf>
- [98] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [99] RAO, C.R., CHAKRAVARTI, I.M., Some small sample tests of significance for a Poisson distribution, *Biometrics* **12** (1956) 264–282.
- [100] SAVAGE, J.R.K., Sites of radiation induced chromosome exchanges, *Curr. Top. Radiat. Res.* **6** (1970) 129–194.
- [101] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Chromosome aberrations in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate”, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man* (ISHIHARA, T., SASAKI, M.S., Eds), Alan R. Liss, New York (1983) 23–49.
- [102] BARQUINERO, J.F., et al., Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis, *Mutat. Res.* **326** (1995) 65–69.
- [103] DI GIORGIO, M., et al., Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode, *Radiat. Prot. Dosim.* **108** (2004) 47–53.
- [104] PAPWORTH, D.G., Curve fitting by maximum likelihood, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 127–140.
- [105] MERKLE, W., Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data, *Radiat. Environ. Biophys.* **21** (1983) 217–233.
- [106] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., REEDER, E.J., The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people, *Mutat. Res.* **72** (1980) 523–532.
- [107] SIGURDSON, A.J., et al., International study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutat. Res.* **652** (2008) 112–121.
- [108] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35–44.
- [109] PETERSON, L.E., PILLS, Poisson iteratively reweighted least squares computer program for additive, multiplicative, power, and non-linear models, *J. Stat. Soft.* **2** (1997) 1–28.
- [110] AINSBURY, E.A., BARQUINERO J.F., Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation: statistical and computational aspects, *Ann. Ist Super Sanita*, **45** (2009) 307–12.
- [111] DEPERAS, J., et al., CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* **124** (2007) 115–123.
- [112] AINSBURY, E.A., LLOYD, D.C., Dose estimation software for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 290–295.
- [113] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., Chromosome dosimetry: The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes, *Radiat. Prot. Dosim.* **1** (1981) 203–208.
- [114] PERRY, P., WOLFF, S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* **251** (1974) 156–158.

- [115] LAMBERT, B., HANSSON, K., LINDSTEN, J., STEN, M., WERELIUS, B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hereditas* **93** (1976) 163–174.
- [116] PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., The effect of blood storage on differential chromosome staining of human lymphocytes, *Experientia* **39** (1983) 778–780.
- [117] HAYATA, I., KAJIMA, J., OKABE, N., Distribution of metaphases in the 1st cell-cycle for automated-system in radiation-dosimetry, *Radiat. Phys. Chem.* **39** (1992) 517–520.
- [118] WILKINSON, D.T., et al., Canadian biodosimetry capacity for response to radiation emergencies, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1128–1132.
- [119] STRICKLIN, D., et al., An initial limited biodosimetry inter-comparison exercise: FOI and DRDC Ottawa, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1133–1137.
- [120] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation *in vitro*, *Experientia* **37** (1981) 407–408.
- [121] MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.* **20** (1960) 613–616.
- [122] HUNGERFORD, D.A., Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Technol.* **40** (1965) 333–338.
- [123] HAYATA, I., et al., Robot system for preparing lymphocyte chromosomes, *J. Radiat. Res.* **33** Suppl. (1992) S231–S241.
- [124] McFEE, A.F., SAYER, A.M., SALOMAA, S.I., LINDHOLM, C., LITTLEFIELD, L.G., Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes, *Environ. Molecul. Mutagen.* **29** (1997) 98–104.
- [125] SASAKI, M.S., “Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* (EVANS, H.J., LLOYD, D.C., Eds), Edinburgh University Press, Edinburgh 62–76 (1978).
- [126] SCOTT, D., LYONS, C.Y., Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage, *Nature* **279** (1979) 756–758.
- [127] KOLIN-GERRESHEIM, J., BAUCHINGER, M., Dependence of the frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **91** (1981) 251–254.
- [128] HAYATA, I., Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations, *Biotechn. Histochem.* **68** (1993) 150–152.
- [129] LATT, S.A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70** (1973) 3395–3399.
- [130] FERNANDES, T.S., LLOYD, D., AMARAL, A., A comparison of different cytological stains for biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 703–711.
- [131] SAVAGE, J.R.K., PAPWORTH, D.G., Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 69–76.
- [132] SZŁUIŃSKA, M., EDWARDS, A., LLOYD, D., Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates, *Radiat. Prot. Dosim.* **123** (2007) 443–449.
- [133] CROW, E.L., GARDNER, R.S., Confidence intervals for the expectation of a Poisson variable, *Biometrika* **46** (1959) 441–453.
- [134] SCHENKER, N., GENTLEMAN, J.F., On judging the significance of differences by examining the overlap between confidence intervals, *Am. Stat.* **55** (2001) 182–182.
- [135] AUSTIN, P.C., HUX, J.E., A brief note on overlapping confidence intervals, *J. Vas. Surg.* (2002) 194–195.
- [136] BRAME, R.S., GROER, P.G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.

- [137] VOISIN P., et al., Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis, *Radiat. Prot. Dosim.* **110** (2004) 443–447.
- [138] DOLPHIN, G.W., “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, *Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969)*, IAEA, Vienna (1969) 215–224
- [139] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., DOLPHIN, G.W., Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation, *Phys. Med. Biol.* **18** (1973) 421–431.
- [140] BARQUINERO, J.F., et al., Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 435–440.
- [141] VOISIN, P., et al., Mathematical methods in biological dosimetry: the 1996 Iranian accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1545–1554.
- [142] SASAKI, M.S., MIYATA, H., Biological dosimetry in atom bomb survivors, *Nature* **220** (1968) 1189–1193.
- [143] BUCKTON, K.E., HAMILTON, G.E., PATON, L., LANGLANDS, A.O., “Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*, Edinburgh University Press, Edinburgh (1978) 142–150.
- [144] BUCKTON, K.E., Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Alan R. Liss, New York (1983) 491–511.
- [145] AWA, A., Analysis of chromosome aberrations in atom bomb survivors for dose assessment: studies at the Radiation Effects Research Foundation from 1968–1993, *Stem Cells* **15** Suppl. 2 (1997) S163–S173.
- [146] LEA, D.E., CATCHESIDE, D.G., The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.* **44** (1942) 216–245.
- [147] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., DRESP, J., Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after  $^{60}\text{Co}$ -irradiation of human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **35** (1979) 229–233.
- [148] DUFRAIN, R.J., LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E., FROME, E.L., “*In vitro* human cytogenetic dose-response systems”, *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier North-Holland, Amsterdam (1980) 358–374.
- [149] МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ, Радиационная авария в Гоянии, МАГАТЭ, Вена (1989).
- [150] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Dosimetric and Medical Aspects of the Radiological Accident in Goiânia in 1987, IAEA-TECDOC-1009, IAEA, Vienna (1998).
- [151] EUROPEAN COMMISSION, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, One Decade after Chernobyl – Summing up the Consequences of the Accident (Proc. Int. Conf. Vienna, 1996), IAEA, Vienna (1996).
- [152] PROSSER, J.S., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., STATHER, J.W., The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro, *Radiat. Prot. Dosim.* **4** (1983) 21–26.
- [153] PRESTON, R.J., BREWEN, J.G., GENGOZIAN, N., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in marmoset and man, *Radiat. Res.* **60** (1974) 516–524.
- [154] VOISIN, P., LLOYD, D., EDWARDS, A., Chromosome aberrations scoring for biological dosimetry in a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **70** (1997) 467–470.
- [155] BASSON, J.K., HANEKOM, A.P., COETZEE, F.C., LLOYD, D.C., Health Physics Evaluation of an Accident Involving Acute Overexposure to a Radiography Source, Rep. PEL-279, Pelindaba, South Africa (1981).
- [156] STEPHAN, G., HADNAGY, W., HAMMERMAIER, C., IMHOF, U., Biologically and physically recorded doses after an accidental exposure to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays, *Hlth Phys.* **44** (1983) 409–411.



- [157] ISHIHARA, T., et al., Chromosome aberrations in persons accidentally exposed to  $^{192}\text{Ir}$  gamma rays, *J. Radiat. Res.* **14** (1973) 328–335.
- [158] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Istanbul, IAEA, Vienna (2000).
- [159] TURAI, I., GÜNALP, B., LLOYD, D., COSSET, J.M., “Medical aspects of the radiological accident in Istanbul”, (Proc. 8th WHO/REMPAN Conf., NRPB), Oxford (2000).
- [160] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., Accidental intake of tritiated water: a report of two cases, *Radiat. Prot. Dosim.* **15** (1986) 191–196.
- [161] PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W., Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridisation, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986) 2934–2938.
- [162] GREULICH, K.M., et al., Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH, *Mutat. Res.* **452** (2000) 73–81.
- [163] MANTI, L., et al., Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions, *Adv. Space Res.* **39** (2007) 1066–1069.
- [164] CHUDоба, I., et al., High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* **84** (1999) 156–160.
- [165] HORSTMANN, M., DURANTE, M., JOHANNES, C., OBE, G., Chromosomal intrachanges induced by swift iron ions, *Adv. Space Res.* (2005) **35** 276–279.
- [166] BRENNER, D.J., et al., Biomarkers specific to densely-ionising (high LET) radiations, *Radiat. Prot. Dosim.* **97** (2001) 69–73.
- [167] DARROUDI, F., et al., A new tool to characterize primary cervical carcinomas: to assess hall-marks and stage specificity, *Cancer Lett.* **287** (2010) 67–74.
- [168] PRIEUR, M., et al., Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of ageing, *Human Genet.* **79** (1988) 147–150.
- [169] DARROUDI, F., Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations?, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 101–109.
- [170] LUCAS, J.N., et al., Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (1992) 53–63.
- [171] TAWN, E.J., The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals, *Mutat. Res.* **199** (1988) 215–220.
- [172] KODAMA, Y., et al., Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 35–39.
- [173] SAVAGE, J.R., TUCKER, J.D., Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 153–161.
- [174] LINDHOLM, C., EDWARDS A.A., Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 559–566.
- [175] TUCKER, J.D., et al., PAINT: A proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting, *Mutat. Res.* **347** (1995) 21–24.
- [176] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., On the scoring of FISH painted chromosome exchange aberrations, *Mutat. Res.* **307** (1994) 345–353.
- [177] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., FISH ‘painting’ patterns resulting from complex exchanges, *Mutat. Res.* **312** (1994) 51–60.
- [178] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BAUCHINGER, M., FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 135–141.

- [179] NATARAJAN, A.T., VYAS, R.C., DARROUDI, F., VERMEULEN, S., Frequencies of x-ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries, *Int. J. Radiat. Biol.* **61** (1992) 199–203.
- [180] SIMPSON, P.J., SAVAGE, J.R.K., Dose–response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **69** (1996) 429–436.
- [181] SIMPSON, P.J., PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R., X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 11–18.
- [182] CORNFORTH, M.N., Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting, *Radiat. Res.* **155** (2001) 643–659.
- [183] LUCAS, J.N., DENG, W., Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 77–86.
- [184] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BRASELMANN, H., NAHRSTEDT, U., BAUCHINGER, M., Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 385–392.
- [185] BARQUINERO, J.F., KNEHR, S., BRASELMANN, H., FIGELI, M., BAUCHINGER, M., DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 315–323.
- [186] CIGARRAN, S., et al., Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations analysed by painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 449–455.
- [187] WU, H., DURANTE, M., LUCAS, J.N., Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: effects of interaction distance, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 781–786.
- [188] CORNFORTH, M.N., et al., Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells, *J. Cell. Biol.* **159** (2002) 237–244.
- [189] WHITEHOUSE, et al., Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations, *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 139–145.
- [190] PRESSL, S., EDWARDS, A. STEPHAN, G., The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations, *Mutat. Res.* **442** (1999) 89–95.
- [191] RAMSEY, M.J., et al., The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutat. Res.* **338** (1995) 95–106.
- [192] BADR, F.M., HUSSAIN, F.H., Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **6** (1982) 122–129.
- [193] BURIM, R.V., et al., Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics, *Mutat. Res.* **560** (2004) 187–198.
- [194] BOTHWELL, A.M., WHITEHOUSE, C.A., TAWN, E.J., The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 7–14.
- [195] TAWN, E.J., CARTMELL, C.L., The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **224** (1989) 151–156.
- [196] VAN DIEMEN, P.C.M., MAASDAM, D., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, *Mutagenesis* **10** (1995) 487–495.

- [197] TUCKER, J.D., et al., Multi-endpoint biological monitoring of phosphine workers, *Mutat. Res.* **536** (2003) 7–14.
- [198] MAENG, S.H., et al., Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers, *Biomarkers* **9** (2004) 418–434.
- [199] BESKID, O., et al., Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH) — Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs, *Mutat. Res.* **620** (2007) 62–70.
- [200] PLUTH, J.M., RAMSEY, M.J., TUCKER, J.D., Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies, *Mutat. Res.* **465** (2000) 101–111.
- [201] STEENLAND, K., et al., Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico, *Environ. Hlth Perspect.* **105** (1997) 1126–1130.
- [202] KIM Y. K., et al., Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* **14** (2004) 453–463.
- [203] SMITH, M. T., et al., Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene, *Cancer Res.* **58** (1998) 2176–2181.
- [204] ZHANG, L., et al., Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers, *Environ. Mol. Mutagen.* **48** (2007) 467–474.
- [205] BESKID, O., DUSEK, Z., SOLANKSY, I., SRAM, R.J., The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals, *Mutat. Res.* **594** (2006) 20–29.
- [206] SRAM R.J., et al., Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons-The interpretation of cytogenetic analysis by FISH, *Toxicol. Lett.* **172** (2007) 12–20.
- [207] DOHERTY, A.T., et al., Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip, *J. Bone Joint Surg.* **83** (2001) 1075–1081.
- [208] DULOUT, F.N., et al., Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* **370** (1996) 151–158.
- [209] NATARAJAN, A. T., et al., <sup>137</sup>Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims, *Mutat. Res.* **400** (1998) 299–312.
- [210] SAKAMOTO-HOJO, E.T., NATARAJAN, A.T., CURADO, M.P., Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to <sup>137</sup>Cs 7.5 years after the accident in Goiânia (Brazil), *Radiat. Prot. Dosim.* **86** (1999) 25–32.
- [211] BAUCHINGER, M., et al., Collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear-industrial personnel, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 259–267.
- [212] SALASSIDIS, K., et al., Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation, *Int. J. Radiat. Biol.* **68** (1995) 257–262.
- [213] LINDHOLM, C., TEKKELE, M., VEIDEBAUM, T., ILUS, T. SALOMAA, S., Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 565–571.
- [214] LINDHOLM, C., et al., Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 883–890.
- [215] DURAN, A., et al., Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **157** (2002) 461–468.

- [216] GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **76** (1998) 159–168.
- [217] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 152–161.
- [218] LINDHOLM, C., SALOMAA, S., Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 21–25.
- [219] MULLER, I., et al., Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63** (2005) 1214–1220.
- [220] XUNCLA, M., et al., Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 243–251.
- [221] SCHMIDBERGER, H., et al., Reciprocal translocations in patients with testicular seminoma before and after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 857–864.
- [222] GEBHART, E., NEUBAUER, S., SCHMITT, G., BIRKENHAKKE, S. and DUNST, J., Use of a three-colour chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure, *Radiat. Res.* **145** (1996) 47–52.
- [223] PALA, F.S., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., *In vitro* transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **474** (2001) 139–146.
- [224] GARDNER, S.N., TUCKER, J. D., The cellular lethality of radiation-induced radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes, *Radiat. Res.* **157** (2002) 539–552.
- [225] HANDE, M.P., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. IV. Dose response, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 441–448.
- [226] XIAO, Y., DARROUDI, F., GRIGOROVA, M., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 1119–1128.
- [227] ROMM, H., STEPHAN, G., Dose dependency of FISH-detected translocations in stable and unstable cells after Cs gamma irradiation of human lymphocytes *in vitro*, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 162–167.
- [228] RODRIGUEZ, P., et al., Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry, *Radiat. Res.* **162** (2004) 31–38.
- [229] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., ZITZELBERGER, H., BRASELMANN, H., AHRSTEDT, U., Radiation-induced chromosomal aberrations analyzed by two colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 179–84.
- [230] FERNANDEZ, J. L., et al., X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2, *Int. J. Radiat. Biol.* **67** (1995) 295–302.
- [231] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* (1995) **68** 429–435.
- [232] HSIEH, W.A., et al., Alpha coefficient of dose-response for chromosome translocations measured by FISH in human lymphocytes exposed to chronic <sup>60</sup>Co gamma rays at body temperature, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 435–439.
- [233] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: State of the art and current views, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 51–58.

- [234] SALISSIDIS, K., SCHMID, E., PETER, R.U., BRASELMANN, H., BAUCHINGER, M., Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl power plant accident, *Mutat. Res.* **311** (1994) 39–48.
- [235] LLOYD, D.C., et al., “Retrospective dosimetry by chromosomal analysis”, The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996), Rep. Eur 16544 EN, (1996) 965–973.
- [236] SNIGIRYOVA, G., BRASELMANN, H., SALASSIDIS, K., SHEVCHENKO, V., BAUCHINGER, M., Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers using chromosome painting and conventional chromosome analysis, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 119–127.
- [237] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Biological dosimetric studies in the Chernobyl radiation accident, on populations living in the contaminated areas (Gomel regions) and in Estonian clean-up workers, using FISH technique”, The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996) Eur 16544 EN, (1996) 1067–1072.
- [238] SALISSIDIS, K., et al., Analysis of symmetrical translocations for retrospective biodosimetry in radiation workers of the Mayak nuclear-industrial complex (Southern Urals) using FISH-chromosome painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1999) 431–439.
- [239] BAUCHINGER, M., et al., FISH-based analysis of stable translocations in a Techa river population, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 605–612.
- [240] TUCKER, J.D., et al., Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility, *Radiat. Res.* **148** (1997) 216–226.
- [241] NAKAMURA, N., MIYAZAWA, C., SAWADA, S., AKIYAMA, M., AWA, A.A., A close correlation between spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 619–627.
- [242] LLOYD, D.C., MOQUET, J.E., ORAM, S., EDWARDS, A.A., LUCAS, J.N., Accidental intake of tritiated water: A cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 543–547.
- [243] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C.H., NATARAJAN, A.T., Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **25** (1988) 97–100.
- [244] STRAUME, T., et al., Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiânia accident, *Hlth Phys.* **60** (1991) 71–76.
- [245] STEPHAN, G., PRESSL, S., Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after *in vitro* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 293–299.
- [246] LINDHOLM, C., et al., Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 647–656.
- [247] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Lilo, IAEA, Vienna (2000).
- [248] ROY, L., et al., Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 39–48.
- [249] DARROUDI, F., et al., Detection of total and partial body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronuclei and premature chromosome condensation assays, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 207–215.
- [250] PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., GERSTENBERG, H.M., BLAKELY, W.F., Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: Studies with fission neutrons, *Hlth Phys.* **72** (1997) 594–600.

- [251] TERZOUDI, G.I., PANTELIS G.E., Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 513–520.
- [252] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Premature chromosome condensation, a novel method for biological dosimetry”, *High Levels of Natural Radiation (Proc. 10th Int. Congr. Vienna, 1993)*, IAEA, Vienna (1993) 479–485.
- [253] KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., HAYATA, I., Dynamic analysis of chromosome aberrations in three victims of the Tokai-mura criticality accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 857–862.
- [254] HAYATA, I., KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., FURUKAWA, A., SASAKI, M.S., Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed cases in the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S149–S155.
- [255] ISHIGURE, N., ENDO, A., YAMAGUCHI, Y., KAWACHI, K., Calculation of the absorbed dose for the overexposed patients at the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Rad. Res.* **42** Suppl. (2000) S137–S148.
- [256] BAUCHINGER, M., BRASELMANN, H., “Use of micronuclei in biological dosimetry of absorbed radiation dose”, *Chromosome Aberrations — Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1989) 202–211.
- [257] KOTELES, G.J., The human lymphocyte micronucleus assay. A review on its applicabilities in occupational and environmental medicine, *Centr. Europ. J. Occup. Environ. Med.* **2** (1996) 12–30.
- [258] FENECH, M., The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* **455** (2000) 81–95.
- [259] FENECH, M., PEREPETSKAYA, G., MIKHALEVICH, L., A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations — Experiences from the Chernobyl catastrophe, *Environ. Mol. Mutagen.* **30** (1997) 112–118.
- [260] MIKHALEVICH, L.S., et al., Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1377–1385.
- [261] FUCIC, A., et al., Genomic damage in children accidentally exposed to ionizing radiation: A review of the literature, *Mutat. Res.* **658** (2008) 111–123.
- [262] KIRSCH-VOLDERS, M., FENECH, M., Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes, *Mutagenesis* **16** (2001) 51–58.
- [263] ROSEFORT, C., FAUTH, E., ZANKL, H., Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis* **19** (2004) 277–284.
- [264] NORPPA, H., RENZI, L., LINDHOLM, C., Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-block human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis* **8** (1993) 519–525.
- [265] HUBER, R., et al., Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 105–109.
- [266] THIERENS, H., et al., Scoring of different cytogenetic endpoints after *in vitro* low dose  $\gamma$ -exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 23–34.
- [267] PALA, F.S., et al., The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation, *Turk. J. Biol.* **32** (2008) 283–290.
- [268] MUELLER, W.U., RODE, A., The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5–15 Gy), *Mutat. Res.* **502** (2002) 47–51.
- [269] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L., ZETTERBERG, G., BERGQVIST, M., GRAWE, J., Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in

- transferring-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* **36** (2000) 22–31.
- [270] STOPPER, H., et al., Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring, *Toxicol. Lett.* **156** (2005) 351–360.
  - [271] GRAWE, J., Evaluation of the reticulocyte micronucleus assay in patients treated with radioiodine for thyroid cancer, *Mutat. Res.* **583** (2005) 12–25.
  - [272] VRAL, A., Micronuclei induced by fast neutrons versus  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays in human peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 321–328.
  - [273] VERHAEGEN, F., VRAL, A., Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET, *Radiat. Res.* **139** (1994) 208–213.
  - [274] WUTTKE, K., MULLER, W.U., STREFFER, C., The sensitivity of the *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities, *Strahlentherapie Onkol.* **174** (1998) 262–268.
  - [275] GERSEY, B., et al., Micronuclei induction in human fibroblasts exposed *in vitro* to Los Alamos high-energy neutrons, *Adv. Space Res.* **40** (2007) 1754–1757.
  - [276] FENECH, M., AITKEN, C., RINALDI, J., Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults, *Carcinogenesis* **19** (1998) 1163–1171.
  - [277] FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., The HUMN Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* **428** (1999) 271–283.
  - [278] THIERENS, H., VRAL, A., DE RIDDER, L., A cytogenetic study of radiological workers : effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, *Mutat. Res.* **360** (1996) 75–82.
  - [279] THIERENS, H., et al., Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus-centromere assay, *Mutagenesis* **15** (2000) 245–249.
  - [280] THIERENS, H., et al., A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay, *Mutat. Res.* **445** (1999) 105–111.
  - [281] CATALAN, J., et al., Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man, *Am. J. Hum. Genet.* **63** (1998) 1464–1472.
  - [282] CARERE, A., ANTOCCIA, A., CIMINI, D., et al., Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-block lymphocytes of 24 male subjects, *Mutagenesis* **14** (1999) 491–496.
  - [283] THIERENS, H., VRAL, A., DERIDDER, L., Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose-response, *Health Phys.* **61** (1991) 623–630.
  - [284] EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D., Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-block human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* **13** (1989) 34–43.
  - [285] LEE, T.K., et al., Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy, *Mutat. Res.* **469** (2000) 63–70.
  - [286] THIERENS, H., VRAL, A., VAN EIJKEREN, M., SPELEMAN, F., DE RIDDER, L., Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease, *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (1995) 529–539.
  - [287] SILVA-BARBOSA, I., PEREIRA-MAGNATA, S., AMARAL, A., SOTERO, G., MELO, H.C., Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation, *Genet. Mol. Biol.* **28** (2005) 452–457.

- [288] LE ROUX, J., SLABBERT, J., SMIT, B., BLEKKENHORST, G., Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-block lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial-body radiotherapy, *Strahlenther. Onkol.* **174** (1998) 75–81.
- [289] IARMARCOVAI, G., et al., Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.* **659** (2008) 274–283.
- [290] MONSIEURS, M., et al., Patient dosimetry after <sup>131</sup>I lipiodol therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **30** (2003) 554–561.
- [291] LIVINGSTON, G.K., FOSTER, A.E., ELSON, H.R., Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes, *J. Toxicol. Environ. Hlth* **40** (1993) 367–375.
- [292] FENECH, M., et al., Micronuclei in cytokinesis-block lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy, *Int. J. Radiat. Biol.* **57** (1990) 373–383.
- [293] DIAS, F.L., et al., Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 228–233.
- [294] SARI-MINODIER, I., et al., Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation, *Mutat. Res.* **629** (2007) 111–121.
- [295] THIERENS, H., et al., Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers, *Hlth Phys.* **83** (2002) 178–182.
- [296] VAGLENOV, A., et al., Cytogenetic monitoring of workers from a nuclear power plant, *Centr. Eur. J. Occupation. Environ. Med.* **3** (1997) 40–47.
- [297] LIVINGSTON, G.K., et al., Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 703–713.
- [298] TANAKA, K., et al., Unstable-type chromosome aberrations in lymphocytes from individuals living near Semipalatinsk Test Site, *J. Radiat. Res.* **47** (2006) Suppl. A159–A164.
- [299] THIERENS, H., et al., Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 408–414.
- [300] MARTIN, P.R., BERDYCHEVSKI, R.E., SUBRAMANIAN, U., BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., Sample tracking in an automated cytogenetic biodosimetry laboratory for radiation mass casualties, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1119–1124.
- [301] FRIEDMAN, L.I., SEVERNS, M.L., Application of robotics in blood banking, *Vox Sang* **51** Suppl. 1 (1986) S57–S62.
- [302] HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P., Evaluation of an automated liquid-handling system (Tecan Genesis RSP 100) in the Abbott LCx assay for *Chlamydia trachomatis*, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 1975–1977.
- [303] DENG, W., TSAO, S.W., LUCAS, J.N., LEUNG, C.S., CHANG, A.L., A new method for improving metaphase chromosome spreading, *Cytometry* **51** (2003) 46–51.
- [304] WEBER, J., SCHEID, W., TRAUT, H., Time saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder, *Metafer2. Mutat. Res.* **272** (1992) 31–34.
- [305] LLOYD, D.C., “Advances in cytogenetic dosimetry”, *The Medical Basis of Radiation Accident Preparedness II: Clinical Experience and Follow Ups since 1979*, (RICKS, R. E., FRY, S. S. E., Eds), Elsevier, New York, NY (1990) 479–487.
- [306] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110, *Mutation Res.* **164** (1986) 101–108.
- [307] LLOYD, D.C., “Automated aberration scoring: the requirements of an end-user”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1989). 9–17.
- [308] LORCH, T., WITTLER, C., STEPHAN, G., BILLE, J., “An automated chromosome aberration scoring system”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer- Verlag, Heidelberg (1989) 19–30.



- [309] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Progress in automatic dicentric hunting”, *Chromosome Alterations, Origin and Significance* (OBE, G., NATARAJAN, A.T., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1994) 192–202.
- [310] STEPHAN, G., “Automatische Analyse dizentrischer Chromosomen”, *Methodische Fragen beim Human Population Monitoring in der Zytogenetik* (ARNDT, D., OBE, G., Eds), MMV Verlag, München (1996).
- [311] VAURIJOUX, A., et al., Strategy for Population Triage Based on Dicentric Analysis, *Radiat. Res.* **171** (2009) 541–548.
- [312] CASTELAIN, P., et al., Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei, *Mutagenesis* **8** (1993) 285–293.
- [313] VERHAEGEN, F., et al., Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-block human lymphocytes by automated image analysis, *Cytometry* **17** (1994) 119–127.
- [314] SCHUNK, C., et al., New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 383–389.
- [315] VARGA, D., et al., An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis* **19** (2004) 391–397.
- [316] DECORDER, I., et al., Automated image analysis of cytokinesis-block micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis* **24** (2009) 85–93.
- [317] KORTHOFF, K., CAROTHERS, A.D., Test of performance of four semi-automatic metaphase-finding and karyotyping systems, *Clin. Gen.* **40** (1991) 441–451.
- [318] VROLIK, J., SLOOS, W.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., TANKE, H.J., A system for fluorescence metaphase finding and scoring of chromosomal translocations visualized by in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 287–295.
- [319] WU, Q., SNELLINGS, J., AMORY, L., SUETENS, P., OOSTERIJNCK, A., “Model-based contour analysis in a chromosome segmentation system”, *Automation of Cytogenetics*, Springer, Heidelberg (1989) 217–229.
- [320] PIPER, J., et al., Automated fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes, *Cytometry* **16** (1994) 7–16.
- [321] MASCIO, L.N., et al., Advances in the automated detection of metaphase chromosomes labelled with fluorescence dyes, *Cytometry* **33** (1998) 10–18.
- [322] МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ, Общие процедуры медицинского реагирования при ядерной или радиологической аварийной ситуации, EPR-MEDICAL, МАГАТЭ, Вена (2009).
- [323] МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ, Руководство для лиц, принимающих первые ответные меры в случае радиологической аварийной ситуации, EPR-FIRST RESPONDERS, МАГАТЭ, Вена (2007).
- [324] NATIONAL COUNCIL OF RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS, Key elements of preparing emergency responders for nuclear and radiological terrorism, Commentary No. 19, Bethesda, MD (2005).
- [325] WASELENKO, J.K., et al., Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Working Group, *Ann. Intern. Med.* **140** (2004) 1037–1051.
- [326] ALEXANDER, G.A., et al., BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 972–996.
- [327] FLYNN, D.F., GOANS, R.E., Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties, *Surg. Clin. N. Am.* **86** (2006) 601–636.
- [328] BLAKELY, W.F., WALTER, C.A., PRASANNA, P.G.S., Early-response biological dosimetry—recommended countermeasure enhancements for mass casualty radiological incidents and terrorism, *Hlth Phys.* **89** (2005) 494–504.

- [329] BLAKELY, W.F., Early Biodosimetry Response: Recommendations for Mass-Casualty Radiation Accidents and Terrorism (Refresher Course for the 12th International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, 19–24 October 2008), [http://www.irpa12.org.ar/PDF/RC/RC\\_12\\_fullpaper.pdf](http://www.irpa12.org.ar/PDF/RC/RC_12_fullpaper.pdf)
- [330] MURATA, H., AKASHI, M., The report of the criticality accident in a uranium conversion test plant in Tokai-mura, NIRS-M-154, National Institute of Radiation Sciences, Japan (2002).
- [331] US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Radiation Event Medical Management, <http://www.remm.nlm.gov/>
- [332] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., MOQUET, J.E., GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1107–1112.
- [333] VOISIN, P., et al., The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **47** (2001) 557–564.
- [334] FLEGAL, F.N., DEVANTIER, Y., MCNAMEE, J.P., WILKINS, R.C., QuickScan dicentric chromosome analysis for radiation biodosimetry, *Health Phys.* **98** (2010) 276–281.
- [335] LINDHOLM, C., et al., Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents, *Radiat. Res.* **173** (2010) 71–78.
- [336] MCNAMEE, J.P., FLEGAL, F.N., BOULAY GREENE, H., MARRO, L., WILKINS R.C., Validation of the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool, *Radiat. Prot. Dosim.* **135** (2009) 232–242.
- [337] YOSHIDA, M.A., et al., The Chromosome Network for biodosimetry in Japan, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1125–1127.
- [338] MILLER, S. M., et al., Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN) for biological dosimetry following radiological/nuclear accidents, *Int. J. Radiat. Biol.* **83** (2007) 471–477.
- [339] WOJCIK, A., LLOYD, D., ROMM, H., ROY, L., Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: Capacity of the EU member states, *Radiat. Prot. Dosim.* **138** (2010) 397–401.
- [340] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, RANET Assistance Action Plan – Arrangements for Providing International Assistance and Sample of Assistance Action Plan, IAEA, Vienna, Austria, 2006.
- [341] BLAKELY, W.F., et al., WHO 1st consultation on the development of a global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies (BioDoseNet), *Radiat. Res.* **171** (2009) 127–39.
- [342] SEVAN'KAEV, A.V., Results of cytogenetic studies of the consequences of the Chernobyl accident, *Radiat. Biol. Radioecol.* **40** (2000) 589–595.
- [343] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **74** (1997) 5–11.
- [344] SHEVCHENKO, V.A., SNIGIRYOVA, G.P., “Cytogenetic effects of the action of ionizing radiations on human population”, *Research Activities about the Radiological Consequences of the Chernobyl NPS Accident and Social Activities to Assist the Sufferers by the Accident* (IMANAKA, T., Ed.), Research Reactor Institute, Kyoto University (1998) 203–215.
- [345] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A survey of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **58** (1995) 85–91.
- [346] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., The retrospective cytogenetic dosimetry using the results of conventional chromosomal analysis in Chernobyl clean-up workers, *Radiat. Biol. Radioecol.* **45** (2005) 700–708.
- [347] SEVAN'KAEV, A.V., et al., Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1149–1152.

- [348] EDWARDS, A., et al., Biological estimates of dose to inhabitants of Belarus and Ukraine following the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **111** (2004) 211–219.
- [349] KOKSAL, G., PALA, F.S., DALCI, D.O., *In vitro* dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by  $^{60}\text{Co}$  gamma-radiation, *Mutat. Res.* **329** (1995) 57–61.
- [350] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C., The fate of chromosomal aberrations in  $^{137}\text{Cs}$ -exposed individuals in the Goiânia radiation accident, *Health Phys.* **60** (1991) 67–70.
- [351] SASAKI, M.S., HAYATA, I., KAMADA, N., KODAMA, Y., KODAMA, S., Chromosome aberration analysis in persons exposed to low-level radiation from the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S107-S116.
- [352] JINARATANA, V., *The Radiological Accident in Thailand*, Parthenon Publishing, (2002) 283–301.
- [353] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Nueva Aldea*, IAEA, Vienna (2009).
- [354] BERTHO, J.M., ROY, L., A rapid multiparametric method for victim triage in cases of accidental protracted irradiation or delayed analysis, *Br. J. Rad.* **82** (2009) 764–770.
- [355] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance*, WHO, Geneva (2006).
- [356] ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях, 3-е издание, ВОЗ, Женева (2004).
- [357] МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ, Глоссарий МАГАТЭ по вопросам безопасности: терминология, используемая в области ядерной безопасности и радиационной защиты, МАГАТЭ, Вена (2008).



## Приложение I

### АНАЛИЗ ДИЦЕНТРИКОВ

В Приложении описывается и рассматривается ряд материалов и методов для получения и обработки культур лимфоцитов, обычно используемых лабораториями во всем мире, хотя, вероятно, не найдется двух лабораторий, где используются совершенно одинаковые методы. В настоящем Приложении приводится подробное пошаговое описание надежного метода, который может оказаться полезным для некоторых лабораторий.

#### I-1. КУЛЬТУРА ЛИМФОЦИТОВ

##### I-1.1. Материалы

- 1) Гепаринизированная цельная кровь.
- 2) Фитогемоагглютинин (ФГА), коммерчески доступный. Если поставляется лиофилизированным, восстановить стерильной водой аналитической чистоты.
- 3) Минимальная питательная культуральная среда Игла (МЕМ), коммерчески доступная: готовая к использованию, концентрация  $\times 10$  или порошок. Рабочие концентрации должны готовиться на стерильной воде аналитической чистоты. Возможно, потребуется добавка L-глутамина, если это указано в инструкциях компании-изготовителя. рН фактор необходимо откорректировать при помощи стерильного бикарбоната натрия.
  - (i) Возможно, в среду, полученную из концентрата, потребуется добавка антибиотиков. Добавить 1 мл первичного раствора антибиотиков в физиологическом растворе к 100 мл среды. Первичный раствор должен содержать 100 МЕ/мл бензилпенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата; его можно хранить в замороженном виде.
- 4) Бромдезоксисуридин (БДУ). Добавить 1 мл первичного раствора в 100 мл среды. Первичный раствор представляет собой 6,4 мг БДУ, разведенного в 10 мл среды и прошедшего мембранную фильтрацию. Это дает конечную концентрацию в культуре 15 мкМ. Раствор может храниться в течение одного месяца в темноте при температуре 4°C или в течение нескольких месяцев при температуре -20°C.
- 5) Термоинактивированная (56°C в течение 0,5 часа) фетальная бычья сыворотка, коммерчески доступная, хранящаяся замороженной.
- 6) Колцемид: Первичный раствор 10 мкг/мл в стерильном физиологическом растворе. Может храниться при температуре 4°C в течение 6 месяцев.
- 7) Стерильные сосуды для культивирования. Имеются различные варианты, например, стеклянные микробиологические матрасы или одноразовые пластиковые контейнеры. Объем должен составлять 15-20 мл.
- 8) Культуры должны быть поставлены в бокс биологической безопасности, класс 2, при затемненном освещении. Жидкости можно переносить между сосудами при помощи одноразовых стерильных шприцев или пипеток. Если кровь нужно передать через шприц с гиподермальной иглой, это должно делаться медленно при использовании иглы с широким отверстием (размер 19), чтобы уменьшить силы сдвига, действующие на клетки.

### **I–1.2. Метод**

- 1) Поместить 0,3 мл гепаринизированной крови в сосуд для культивирования.
- 2) Добавить 4,0 мл культуральной среды, в которую уже были введены антибиотики и БДУ.
- 3) Добавить 0,1 мл восстановленного ФГА.
- 4) Добавить 0,5 мл фетальной бычьей сыворотки.
- 5) Плотнo закрыть крышку.
- 6) Перемешать содержимое сосуда осторожным встряхиванием.
- 7) Инкубировать при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в темноте в течение 45 часов.
- 8) Добавить 50 мкл основного раствора колцемида в культуру и осторожно потрясти.
- 9) Возвратить в инкубатор еще на три часа.

## **I–2. ФИКСАЦИЯ И ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ**

### **I–2.1. Метод**

- 1) Переместить содержимое сосуда для культивирования в пробирку центрифуги.
- 2) Центрифугировать пробирку при 200 g в течение 10 минут (при пересчете g в об./мин. использовать  $g = r\omega^2/981$ , где r = радиус в см и  $\omega = (2\pi \times \text{об./мин.}/60)$ ).
- 3) Удалить супернатант всасыванием и ресуспендировать сгусток клеток в 5-10 мл раствора хлорида калия 0,075M.
- 4) Дать пробирке постоять при комнатной температуре в течение 15-20 минут.
- 5) Снова центрифугировать пробирку при 200 g в течение 10 минут.
- 6) Удалить супернатант и ресуспендировать клетки в 5-10 мл свежеприготовленного фиксатора метанол/уксусная кислота 3:1. Фиксатор должен добавляться медленно, но с постоянной скоростью, с энергичным перемешиванием, при этом идеально использовать вихревую мешалку, чтобы препятствовать комкованию сгустка клеток. Дальнейшая помощь в предотвращении комкования состоит в использовании латексной резиновой груши на пипетке Пастера для осторожного перемешивания сгустка клеток перед добавлением фиксатора.
- 7) Снова выполнить центрифугирование.
- 8) Удалить супернатант и выполнить ресуспендирование в 5-10 мл фиксатора.
- 9) Снова выполнить центрифугирование.
- 10) Удалить супернатант и выполнить ресуспендирование в 5-10 мл фиксатора.
- 11) Снова выполнить центрифугирование.
- 12) Удалить супернатант, оставив его лишь 0,25 мл, и выполнить ресуспендирование сгустка клеток в оставшейся жидкости.
- 13) Взять суспензию клеток в пипетку Пастера.
- 14) Взять чистое обезжиренное предметное стекло, которое перед этим хранилось в морозильнике. Расплавить иней на стекле дыханием.
- 15) Дать одной или двум каплям суспензии стечь на предметное стекло с высоты как минимум 10 см.

- 16) Приготовить по крайней мере два таких препарата от каждой культуры.
- 17) Подержать препараты над электрической плиткой для высыхания в умеренном тепле.

### I-3. ОКРАШИВАНИЕ

#### I-3.1. Материалы

- 1) Краситель Хехст 33258, Первичный раствор концентрации  $\times 1000$  в 50 мкг/мл фосфатного буфера рН = 6,8, может храниться в темноте при температуре 4°C.
- 2) Краситель Гимза.
- 3) Фосфатный буфер (рН = 6,8), приготовленный из коммерчески доступных таблеток.
- 4) 2 x SSC (хлорид натрия и цитрат натрия): 17,53 хлорида натрия, 8,82 цитрата натрия, дистиллированная вода для получения 1,0 л.
- 5) Ксилол и среда DPX.
- 6) Ультрафиолетовая лампа ( $> 310$  нм) или флуоресцентная полосовая лампа.

#### I-3.2. Методы

Между подготовкой препаратов и началом ФПГ-окрашивания должно пройти несколько дней (до пяти) выдерживания при комнатной температуре, а при традиционном окрашивании красителем Гимза препараты можно использовать, как только они высохнут. Альтернативно, препараты можно высушить при температуре 37°C и ФПГ-окрасить на следующий день.

##### *Флуоресценция плюс окрашивание красителем Гимза (ФПГ)*

- 1) Нанести ок. 10 капель красителя Хехст (разбавленный из первичного раствора до 0,5мкг/мл) на препарат и накрыть покровным стеклом.
- 2) Нанести препарат на лист алюминиевой фольги и положить под ультрафиолетовую лампу на 0,5 часа.
- 3) Осторожно снять покровное стекло.
- 4) Выполнить отмывку буфером с рН = 6,8.
- 5) Поместить препарат в 2 x SSC с температурой 60°C на 20-30 минут.
- 6) Выполнить отмывку дистиллированной водой.
- 7) Поместить препарат в краситель Гимза — 5-10%-ый раствор с рН = 6,8 на 3 минуты.
- 8) Быстро ополоснуть в буфере.
- 9) Быстро ополоснуть в дистиллированной воде.
- 10) Высушить на воздухе.
- 11) Осветлить и накрыть покровным стеклом.

##### *Традиционная окраска красителем Гимза*

- 1) Поместить препарат в 2%-ый краситель Гимза с рН = 6,8 на 5 минут.
- 2) Выполнить отмывку в буфере.

- 3) Быстро ополоснуть в дистиллированной воде.
- 4) Высушить на воздухе.
- 5) Осветлить и накрыть покровным стеклом.



## Приложение II

### АНАЛИЗ ТРАНСЛОКАЦИЙ МЕТОДОМ FISH

В описанной ниже процедуре используются как прямо-, так и непрямо-меченые зонды (коммерчески доступные), и описывается окрашивание трех пар хромосом в различные цвета, всех центромер в четвертый цвет, и контрастное окрашивание остальных хромосом. Компании-изготовители поставляют протоколы, к которым можно обращаться при работе с использованием описанного ниже метода.

#### II-1.1. Предварительная обработка

Промыть предметные стекла фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) в течение 5 минут при комнатной температуре. Обезводить препараты в батарее этаноловых спиртов (70, 90 и 100 %), по 2-5 минут на каждый шаг, при комнатной температуре, и высушить на воздухе.

#### II-1.2. Обработка РНКазой и пепсином

Перемешать 445 мкл воды, 50 мкл 20 х SSC и 5 мкл РНКазы А (10 мкг/мл) (смесь – можно приготовить заранее и хранить при температуре -20°C). Пипеткой нанести 100 мкл РНКазы А на препарат, накрыть покровным стеклом. Инкубировать во влажной камере при температуре 37°C в течение 60 минут.

Промыть три раза с 2 х SSC (5 минут каждый раз при комнатной температуре). Во время первой промывки снять покровное стекло. Далее промыть раствором PBS при комнатной температуре в течение 5 минут. Для обработки пепсином (0,005% в HCl 10 mM), подготовить заранее смесь, состоящую из 50 мкл пепсина (10%), 99 мл воды и 1 мл HCl 1N. Эту смесь до использования можно хранить при температуре -20°C. Предварительно подогреть смесь в водяной бане при температуре 37°C и нанести 100 мкл на каждый препарат на 1-2 минуты. Промыть раствором PBS при комнатной температуре в течение 5 минут.

Промыть составом MgCl<sub>2</sub>-PBS 50 mM (5 мл MgCl<sub>2</sub> и 95 мл PBS) при комнатной температуре в течение 5 минут. Промыть 1%-ым формальдегидом в MgCl<sub>2</sub>-PBS при комнатной температуре в течение 10 минут. Ополоснуть в растворе PBS при комнатной температуре в течение 5 минут. Высушить на воздухе в батарее этаноловых спиртов (70, 90 и 100 %), по 2-5 минут на каждый шаг, при комнатной температуре.

#### II-1.3. Протокол FISH для зондов окрашивания хромосом в комбинации с панцентромерными зондами

Нагреть зонды окрашивания хромосом до 42°C и хорошо потрясти до начала использования. Поместить достаточное количество каждого красителя хромосом в пробирку Эппендорфа, содержащую гибридизационный буфер; хорошо потрясти и центрифугировать.

##### *а) Денатурация*

Красители хромосом могут быть денатурированы путем инкубации при температуре 65°C в течение 10 минут в водяной бане. Далее положить лед на 2-3 минуты, переместить на водяную баню (37°C) и инкубировать в течение 60 минут.

Когда используются красители хромосом в комбинации с панцентромерным зондом, начать нагревать панцентромерный зонд и гибридизационный буфер при температуре 37°C за 30 минут до конкуренции зонда. Денатурировать панцентромерный зонд путем инкубации в водяной бане при температуре 85°C в течение 10 минут, далее немедленно положить лед на 2-3 минуты.

Для трехцветного метода FISH с панцентромерным зондом необходимо использовать окончательный объем 18-20 мкл гибридизационной смеси на один препарат (т.е. на 3 мкл каждого из трех концентрированных зондов окрашивания добавить 1,6 мкл его соответствующего буфера и добавить 2-3 мкл концентрированного панцентромерного зонда).

Например, когда окрашиваются три хромосомы № 1, 4 и 8: Хромосома №1 (биотин), №4 биотин/FITC, №8 FITC и CP FITC, они дадут сигнал красного, желтого, зеленого и зеленого цвета, соответственно.

#### *б) Предварительная гибридизация*

Предварительную гибридизацию препаратов необходимо начать приблизительно за 30 минут до окончания конкуренции зонда. Нанести 100 мкл 70%-го раствора формамида в 2 x SSC и 50 мМ раствора PBS на один препарат и накрыть его покровным стеклом (350 мкл деионизированного 100%-го формамида (хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ), 50 мкл раствора 0,5М PBS (хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ) и 50 мкл 20 x SSC). Формамид необходимо деионизировать незадолго до его использования.

Денатурировать препараты при температуре  $70^{\circ}\text{C}$  на электроплитке в течение 2,5 минут. Высушить препараты на воздухе в батарее этаноловых спиртов (хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 70% в течение 5 минут, 90% и 100 % в течение 2-5 минут каждый, при комнатной температуре.

#### *с) Гибридизация*

Хорошо перемешать все красители хромосом и панцентромерные зонды в одной пробирке Эппендорфа. Центрифугировать в течение нескольких секунд, поместить 20 мкл смеси на каждый препарат, накрыть покровным стеклом, герметизировать резиновым клеем и высушить на воздухе. Далее препараты необходимо инкубировать во влажной камере при температуре  $42^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Это время может быть увеличено до двух дней.

Детекция:

- 1) Подготовить промывочный раствор (WS) 4 x SSC, содержащий 0,05%-ый Tween 20.
- 2) Развести блокирующий белок в 15%-ом (по объему) промывочном растворе.
- 3) Использовать разбавленный блокирующий белок для разбавления антител следующим образом:
  - 3.1.1 Первый слой B3 (1:500), техасский красный авидин.
  - 3.1.2 Второй слой B4 (1:250), биотинилированный козий анти-авидин.
  - 3.1.3 F1 (1:200), кроличий анти-FITC.
  - 3.1.4 Третий слой B3 (1:500) F2-FITC, козий антикроличий IgG.
  - 3.1.5 F2 (1:100).
- 4) Инкубировать в темноте в течение 10 минут при комнатной температуре, микроцентрифугировать при 11000 g в течение 10 минут, и использовать супернатант.
- 5) Предварительно нагреть следующие растворы до  $42^{\circ}\text{C}$ :
  - i) Промывочный раствор.
  - ii) Некоторое количество 2 x SSC.
  - iii) 50%-ый раствор формамида в 2 x SSC.

- iv) 0,1% x SSC.
- 6) Осторожно снять покровные стекла в сосуде с нагретым 2 x SSC.
- 7) Промывать препараты в нагретых растворах следующим образом:
  - i) Промывочный раствор.
  - ii) Некоторое количество 2 x SSC.
  - iii) 50%-ый раствор формамида в 2 x SSC.
- 8) Нанести 100 мкл разбавленного блокирующего белка на каждый препарат и накрыть покровным стеклом, инкубировать во влажной камере при температуре 37°C в течение 15-20 минут.
- 9) Промыть препараты 0,05%-ым раствором Tween 20 в 4 x SSC при температуре 42°C в течение 2-5 минут.
- 10) Нанести 100 мкл первого слоя антител на каждый препарат и накрыть покровным стеклом. Инкубировать во влажной камере при температуре 37°C в течение 20-30 минут.
- 11) Промыть препараты 0,05%-ым раствором Tween 20 в 4 x SSC три раза при температуре 42°C в течение 5 минут каждый.
- 12) Нанести 100 мкл второго слоя антител на каждый препарат и накрыть покровным стеклом. Инкубировать во влажной камере при температуре 37°C в течение 20-30 минут.
- 13) Промыть препараты 0,05%-ым раствором Tween 20 в 4 x SSC три раза при температуре 42°C в течение 5 минут каждый.
- 14) Нанести 100 мкл третьего слоя антител на каждый препарат и накрыть покровным стеклом. Инкубировать во влажной камере при температуре 37°C в течение 20-30 минут.
- 15) Промыть препараты 0,05%-ым раствором Tween 20 в 4 x SSC три раза при температуре 42°C в течение 5 минут каждый.
- 16) Обезводить препараты в батарее этаноловых спиртов 70, 90 и 100 %, при комнатной температуре в течение 2-5 минут каждый.
- 17) Дать препаратам высохнуть на воздухе.
- 18) Выполнить контрастное окрашивание красителем DAPI (0,15 мкг/мл в среде Vectashield), 25 мкл на препарат под покровное стекло.

Если все сигналы окрашивания окажутся недостаточно яркими, после шага 15 можно сделать еще один раунд второго и третьего слоев путем повторение шагов с 12 по 15. Альтернативно, если бледен лишь один из цветов, то можно повторить шаги B3 / отмывка / B4 для красного техасского или F1 / отмывка / F2 для FITC.



## Приложение III

### ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМОСОМ (РСС)

#### III-1. ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМОСОМ ПУТЕМ МИТОТИЧЕСКОГО СЛИЯНИЯ

Выполняется слияние одноядерных клеток периферической крови человека с митотическими клетками яичника китайского хомячка (СНО) в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ). В результате слияния этих клеток всего лишь через один час в одноядерных клетках крови происходит конденсация хроматина, после чего оболочки их ядер быстро растворяются, и происходит дальнейшая конденсация хроматина в 46 ( $2n = 46$ ) однохроматидных хромосомах.

##### III-1.1. Выделение лимфоцитов периферической крови человека

Для отделения одноядерных клеток из антикоагулированной крови можно использовать пробирки LeucoPREP или Ficoll-Нураque для разделения клеток.

##### А. Пробирки LeucoPREP

LeucoPREP представляет собой систему пробирок, содержащих разделительную среду, где, как в Ficoll-Нураque, более низкая плотность одноядерных клеток и тромбоцитов используется для их отделения от остальных компонентов антикоагулированной цельной крови. Разделение происходит, когда кровь помещена в пробирку над слоем геля, и пробирка центрифугируется с заданным центробежным ускорением в течение заданного времени. Последующие отмывки и центрифугирования уменьшают количество присутствующих тромбоцитов. Полученные препараты жизнеспособных одноядерных клеток можно использовать для РСС.

- 1) Хранить пробирки LeucoPREP (10 мл) в вертикальном положении при комнатной температуре (18–25°C).
- 2) Выполнить забор крови из вены в гепаринизированную пробирку.
- 3) Разделение крови, антикоагулированной гепарином, должно быть выполнено в течение двух часов после забора крови.
- 4) Добавить чистую кровь (8-10 мл) в каждую пробирку LeucoPREP, далее центрифугировать при 400-600 g в течение 15 минут при комнатной температуре.
- 5) После центрифугирования одноядерные клетки и тромбоциты будут находиться в пушистом белом слое сразу под слоем плазмы. Максимально аспирировать плазму без аспирации клеток. Собрать слой клеток пипеткой Пастера и перенести его в 10-миллилитровую коническую центрифужную пробирку с крышкой.
- 6) Мягко ресуспендировать сгусток клеток на вортексе. Добавить среду F10 (10 мл), перемешать клетки, переворачивая пробирки 3 - 4 раза, далее центрифугировать при 100 g в течение 10 минут.
- 7) Повторить шаг 5 еще один раз.

## **В. Система градиентного разделения Ficoll-Нураque**

Ficoll-Nuраque представляет собой водный раствор плотностью  $1,077 \pm 0,001$  г/мл, содержащий 5,7 г Ficoll 400 и 9 г натрия диатризоата в каждом 100 мл.

- 1) Выполнить забор крови из вены в гепаринизированную пробирку.
- 2) Разбавить пробы крови равным объемом сбалансированного солевого раствора.
- 3) Поместить ок. 5 мл разбавленной крови (капля за каплей) поверх Ficoll-Нураque (3 мл) без смешивания.
- 4) Центрифугировать пробирки при 400 g в течение 30 минут при температуре 8–10°C.
- 5) Собрать лимфоциты (средний слой) и отмыть три раза (центрифугировать при 100 g в течение 10 минут) 5 миллилитрами культуральной среды F-10 плюс 5%-ая фетальная бычья сыворотка.

Выделенные лимфоциты можно использовать сразу же для экспериментов РСС или замораживать для будущего использования.

### **III–1.2. Замораживание выделенных лимфоцитов**

После второй отмывки с F-10 и центрифугирования мягко ресуспендировать сгусток клеток на вортексе и получить суспензию клеток в соотношении 1:1, F-10 + 40%-ая фетальная бычья сыворотка (FCS): F-10 + 40%-ая FCS + 20%-ый диметилсульфоксид. Получить суспензию клеток таким образом, чтобы каждая ампула (1,5 мл) содержала приблизительно  $8 \times 10^6$  выделенных лимфоцитов. Для оптимального замораживания лучше использовать морозильный аппарат, который может постепенно снижать температуру. Далее хранить замороженные ампулы при температуре -110°C или в жидком азоте.

### **III–1.3. Размораживание выделенных лимфоцитов**

Вынуть ампулы с лимфоцитами из морозильника и поместить их непосредственно в водяную баню (37°C). Когда они немного оттают, перенести всю суспензию в центрифужную пробирку (10 мл). Добавить 10 мл холодного (4°C) RPMI + 40%-ую фетальную бычью сыворотку (FCS) на суспензию лимфоцитов, медленно раскапывая капля за каплей (приблизительно в течение 30 минут), далее центрифугировать при 100 g в течение 10 минут. Ресуспендировать сгусток клеток в 5 мл RPMI + 5%-ая фетальная бычья сыворотка. Эти одноклеточные лимфоциты можно использовать для экспериментов РСС.

### **III–1.4. Сбор и подготовка митотических клеток яичника китайского хомячка**

Клетки яичника китайского хомячка (СНО) выращивают в культуральных матрасах или флаконах (750 мл) в полной среде (F-10 + 15%-ая фетальная бычья сыворотка и антибиотики (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл)). Колцемид (0,1 мкг/мл) добавляется в клетки на экспоненциальной фазе роста, а митотические клетки собираются при помощи стандартной процедуры селективного отделения (стряхивания) спустя 4-5 часов. Клетки СНО могут также выращиваться в течение больше чем двух клеточных циклов (~32 часа) в полной среде с добавлением БДУ (конечная концентрация 5 мкМ). Все полученные митотические клетки СНО дифференциально окрашиваются, и их цвет кажется бледным после ФПГ-окрашивания, поэтому лимфоциты РСС лучше дифференцируются среди митотических клеток СНО.

1) Замораживание митотических клеток СНО

Митотические клетки СНО могут быть либо подготовлены и немедленно использованы для слияния, либо взяты из запаса клеток, замороженных в полной среде с добавлением 8%-ого диметилсульфоксида. Распределить их на малые аликвоты ( $2,5 \times 10^6$ /ампула в 1,5 мл) и хранить при температуре  $-110^\circ\text{C}$ .

2) Размораживание митотических клеток СНО

Взять ампулы с митотическими клетками СНО из морозильника и поместить их в водяную баню с температурой  $37^\circ\text{C}$ , затем перенести суспензию клеток в центрифужную пробирку и добавить 10 мл среды. Центрифугировать при 100 g в течение 10 минут. Удалить супернатант, добавить среду (5 мл) и держать их на льду до использования.

### **III–1.5. Подготовка раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ)**

Поместить 400 мг полиэтиленгликоля (M.W. 1450, Sigma, 40% объемного веса) в небольшую (10 мл) круглодонную центрифужную пробирку и добавить 600 мкл сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS) или фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) или среды F-10, и оставить пробирки в водяной бане с температурой  $37^\circ\text{C}$  на 15 минут. Полиэтиленгликоль также можно расплавить сначала в печи, а затем смешать с HBSS или PBS или средой F-10.

### **III–1.6. Слияние клеток**

- 1) Интерфазные лимфоциты и митотические клетки СНО по отдельности однократно промыть с HBSS или F-10 (5 мл). Центрифугировать при 100 g в течение 5 минут, и далее удалить супернатант. В круглодонной культуральной пробирке смешать интерфазные клетки с митотическими клетками СНО (5:1) в 10 мл среды F-10 на и центрифугировать при 100 g в течение 5 минут (при более высоких скоростях сгусток клеток может переуплотниться).
- 2) Слить супернатант и держать пробирку перевернутой. Промокнуть оставшиеся капли среды, поместив пробирки вверх дном в штатив для пробирок на бумажное полотенце.
- 3) В случае образования воздушных пузырьков в верхней части сгустка клеток в пробирке их необходимо удалить пипеткой Пастера.
- 4) Микропипеткой (200 мкл) взять 0,15 мл полиэтиленгликоля и поместить его непосредственно в сгусток клеток, поставить пробирку в штатив на 1,5 мин. Очень мягко встряхнуть пробирку лишь три раза (с 30-секундным интервалом). На этот момент сгусток клеток должен казаться отделенным от дна пробирки, с образованием больших комков в растворе полиэтиленгликоля.
- 5) Добавить 1,5-2 мл F-10 или буфера PBS очень медленно в течение 3 минут (0,5 мл в минуту). Перемешать суспензию клеток, мягко постукивая по пробирке.
- 6) Центрифугировать пробирку при 100 g в течение 5 минут.
- 7) Полностью слить супернатант и добавить 0,5 мл культуральной среды (F-10 плюс 15%-ая фетальная бычья сыворотка). В конце добавить 50 мкл колцемида (конечная концентрация 1 мкг/мл), мягко постукивая по пробирке для образования небольших комков. Инкубировать пробирку при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 часа. К этому времени слияние клеток и индукция РСС будут закончены.

### **III–1.7. Протокол фиксации**

- 1) Добавить 7-8 мл предварительно нагретого гипотонического раствора (KCl, 5,6 г/л) в каждую пробирку и инкубировать при температуре 37°C в течение 10 минут.
- 2) Центрифугировать пробирку при 100 g в течение 5 минут.
- 3) Удалить супернатант до уровня 0,5 мл выше осадка. Клетки фиксируются в 5 мл смеси метанола и уксусной кислоты (3:1).
- 4) Центрифугировать пробирку при 100 g в течение 5 минут.
- 5) Повторить шаги 3 и 4 еще два раза.
- 6) После последнего центрифугирования, удалить супернатант и оставить ок. 0.3 мл фиксирующего раствора выше осадка. Далее осторожно вскрыть осадок и добавить ок. 0,5-1 мл фиксатора, слегка постукивая по пробирке.

### **III–1.8. Подготовка предметных стекол**

Нанести клетки на предварительно очищенные предметные стекла при помощи пипетки Пастера с узким носиком. Наблюдая за интерференционными кольцами, осторожно продуть под инфракрасной лампой.

### **III-1.9. Протокол окрашивания**

В тех случаях, когда митотические клетки СНО предварительно не маркированы бромдезоксисуридином, препараты можно окрасить 3%-ым водным раствором красителя Гимза (модификация Guitt R66) в течение 5 минут.

Когда митотические клетки СНО предварительно маркированы бромдезоксисуридином, препараты можно окрасить по методу ФПГ (Раздел 9.3.) В конце ополоснуть препараты дистиллированной водой, дать им высохнуть, после чего поместить под покровные стекла 24 x 60 мм. Однако следует обратить внимание на оговорку в Разделе 11.2.1.6, что этот метод окрашивания часто не является предпочтительным, и простого окрашивания красителем Гимза должно быть достаточно.

При дифференциальном С-окрашивании для РСС (для анализа дицентриков) свежеприготовленные препараты обработать в 1N HCl в течение 5 минут с последующей отмыжкой в 0,2N HCl в течение 5 минут. Далее высушить предметные стекла бумажным полотенцем и обработать раствором Ba(O)<sub>2</sub> (5%) в течение 3 минут при комнатной температуре. Далее выполнить их отмыжку в 0,2N HCl в течение 5 минут. После этого инкубировать стекла в 2 x SSC при 60°C в течение 30 мин. Отмыть буфером Гарра (pH = 6,8) и окрашивать 6%-ым красителем Гимза в течение 30 минут. В заключение ополоснуть стекла водопроводной водой, дать им высохнуть, и поместить под покровные стекла. Обратите внимание на то, что данный метод несколько отличается от метода, описанного в Разделе 9.3.3, но оба метода работают.

Для обнаружения транслокаций можно использовать цельнохромосомно-специфические зонды совместно с панцентромерным зондом, далее использовать тот же протокол, что для метафаз (см. Приложение II и Рис. 37). Это позволяет одновременно обнаруживать дицентрики и транслокации.



## III-2. ХИМИЧЕСКИ ИНДУКЦИРОВАННАЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМОСОМ

### III-2.1. Использование выделенных лимфоцитов

- 1) Поместить 3 мл гепаринизированной цельной крови в пробирку LeukoPREP или Ficoll-Huраque.
- 2) Центрифугировать при 700 g в течение 15 минут при комнатной температуре.
- 3) Перенести выделенные лимфоциты в 15 мл пробирку, содержащую 5 мл среды с добавлением 20%-ой фетальной бычьей сыворотки, для отмывки.
- 4) Центрифугировать при 200-400 g в течение 10 минут при температуре 4°C.
- 5) Ресуспендировать лимфоциты в 6 мл культуральной среды с добавлением 20%-ой фетальной бычьей сыворотки и ФГА.
- 6) Инкубировать при температуре 37°C в течение 47 часов (факультативно добавляется 40 нг/мл колцемида через 24 часа после начала культивирования).
- 7) Добавить каликулин-А с конечной концентрацией 50 нМ в культуру и инкубировать при температуре 37°C в течение 1 часа.
- 8) Подготовить теплый (37°C) гипотонический раствор 0,075M KCl.
- 9) Центрифугировать клетки при 200–400 g в течение 5–10 минут и удалить супернатант.
- 10) Добавить 2 мл 0.075M KCl к осадку и инкубировать при температуре 37°C в течение 20 минут.
- 11) Добавить 30 мкл смеси метанола и уксусной кислоты (3:1) и слегка постучать по пробирке.
- 12) Центрифугировать при 200-400 g в течение 5–10 минут при комнатной температуре.
- 13) Добавить 1,8 мл смеси метанола и уксусной кислоты после удаления супернатанта и переместить в 2 мл пробирку.
- 14) Хранить пробирку при температуре -20°C до приготовления препарата.

### III-2.2. Использование цельной крови

- 1) Поместить 0,75 мл гепаринизированной цельной крови в 15 мл пробирку.
- 2) Довести до суммарного объема 10 мл путем добавления культуральной среды, в которую добавлена 20%-ой фетальная телячья сыворотка и ФГА.
- 3) Инкубировать при температуре 37°C в течение 47 часов (факультативно добавляется 40 нг/мл колцемида через 24 часа после начала культивирования).
- 4) Добавить каликулин-А с конечной концентрацией 30 нМ в культуру и инкубировать при температуре 37°C в течение 1 часа.
- 5) Центрифугировать при 200-400 g в течение 5–10 минут при комнатной температуре.
- 6) Добавить 5 мл 0,075M KCl после удаления супернатанта и инкубировать при температуре 37°C в течение 25 минут.

- 7) Добавить 30 мкл смеси метанола и уксусной кислоты (3:1) и слегка постучать по пробирке.
- 8) Центрифугировать при 200-400 g в течение 5–10 минут при комнатной температуре.
- 9) Добавить 2 мл смеси метанола и уксусной кислоты (3:1).
- 10) Повторять шаги 8 и 9, пока осадок не станет прозрачным.
- 11) Перенести суспензию клеток в 2 мл пробирку.
- 12) Хранить пробирку при температуре -20°C до приготовления препарата.

## Приложение IV

### МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (СВМН)

Ниже приведен простой стандартный протокол, который хорошо себя зарекомендовал. Существуют другие методики с большим числом этапов, где используются культуры изолированных лимфоцитов [1], но для задач обычной биологической дозиметрии достаточно культур цельной крови.

#### IV-1. СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА

- 1) Забор пробы крови осуществляется с использованием антикоагулянта литий-гепарина.
- 2) Как правило, 0,5 мл цельной крови добавляется в 4,5 мл культуральной среды (RPMI-1640), в которую введено 10-15% термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки, L-глутамин и антибиотики. 100 мкл фитогеомоагглютинина – (например, ФГА-М, Сигма, 25 мг/25 мл H<sub>2</sub>O) добавляется в культуру для получения конечной концентрации 20 мкг/мл.
- 3) Кровь культивируют в колбах для культур клеток тканей при температуре 37°C, 5%-ый CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере.
- 4) 20 мкл цитохалазина-B (Cyt-B) добавляют в культуру через 24 часа после ФГА-стимуляции для получения конечной концентрации 6 мкг/мл. Это оптимальная концентрация для аккумуляции двухъядерных клеток в культурах цельной крови. Поскольку Cyt-B плохо растворяется в водном растворе, необходимо приготовить первичный раствор Cyt-B в диметилсульфоксиде (5 мг Cyt-B в 3,3 мл диметилсульфоксида), разделить на аликвоты и хранить при температуре -20°C, пока он не потребуется.
- 5) Культивирование заканчивается через 68–72 часов после ФГА-стимуляции. Время сбора клеток следует выбирать таким образом, чтобы максимизировать число двухъядерных клеток и минимизировать число одноядерных и многоядерных клеток.
- 6) Клетки мягко центрифугируются при 180 g в течение 10 минут, и супернатантная культуральная среда удаляется.
- 7) Клетки гипотонически обрабатываются 7 миллилитрами холодного (4°C) 0,075M KCl для лизирования эритроцитов и немедленно центрифугируются при 180 g в течение 10 минут.
- 8) Супернатант удаляется и заменяется 5 миллилитрами свежеприготовленного фиксатора, состоящего из смеси метанола и уксусной кислоты (10:1), разбавленной в отношении 1:1 раствором Рингера (4,5 г NaCl, 0,21 г KCl, 0,12 г CaCl<sub>2</sub> в 500 мл H<sub>2</sub>O). При добавлении фиксатора следует встряхивать клетки для предотвращения образования комков. Далее клетки снова центрифугируются при 180 g в течение 10 минут.
- 9) Далее клетки отмываются двумя или тремя порциями свежеприготовленного фиксатора, состоящего из смеси метанола и уксусной кислоты (10:1), на сей раз без раствора Рингера, пока суспензия клеток не станет прозрачной.

- 10) После удаления супернатанта до 1 см или меньше выше уровня клеточной массы (в зависимости от размера клеточной массы), клетки повторно осторожно ресуспендируются, и суспензию раскапывают на чистые стекла и дают высохнуть на воздухе.
- 11) Для анализа под оптическим микроскопом клетки могут быть окрашены 2-6%-ым красителем Гимза (например, азур-эозин-метиленовая синька, Мерк) в буфере HEPES (0,03M; pH=6,5) в течение 10–20 минут в темноте, с последующим быстрым ополаскиванием в дистиллированной воде и высушиванием на воздухе. Для флуоресцентной микроскопии клетки могут быть окрашены, как вариант, оранжевым акридином (10 мкг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером, pH=6,9) в течение 2–3 секунд.

#### IV-2. ПРОТОКОЛ ОКРАШИВАНИЯ ЦЕНТРОМЕР МИКРОЯДЕР

Для анализа центромер в микроядрах можно использовать коммерческий панцентромерный FISH-зонд. Панцентромерный зонд можно также создать путем ПЦР-амплификации (прямой праймер: 5'-GAA GCT TAA CTC ACA GAG TTG AA-3' обратный праймер: 5'-GCT GCA GAT CAC AAA GAA GTT TC-3') [2].

Ниже приведен протокол гибридизации *in situ* для коммерческого зонда:

- 1) Препараты готовятся согласно стандартному протоколу CBMN, приведенному выше (до этапа 10).
- 2) Обезводить клетки, проводя препараты через батарею этаноловых спиртов 70-90-100%, по 2 минуты в каждом, и высушить.
- 3) Денатурировать препараты:
  - i) денатурировать хроматин на препарате в 70%-ом растворе формамида в 2 x SSC при температуре 70°C в течение 2 минут;
  - ii) погрузить стекла в ледяной 70%-ый этанол и выполнить обезвоживание, проводя препараты через батарею этаноловых спиртов 70-90-100%, по 5 минут в каждом, со встряхиванием.
- 4) Денатурировать зонд непосредственно перед использованием:
  - i) нагревать зонд при температуре 37°C в течение 5 минут;
  - ii) денатурировать зонд при температуре 85°C в течение 10 минут (10 мкл/стекло);
  - iii) быстро перемешать на вортексе и центрифугировать;
  - iv) немедленно охладить на льду и держать в темноте.
- 5) Гибридизация:
  - i) нанести 10 мкл зонда на предметное стекло, установить покровное стекло и герметизировать резиновым цементом;
  - ii) провести гибридизацию в течение ночи при температуре 37°C в темноте в увлажненной камере.
- 6) Послегибридизационная отмывка:
  - i) удалить резиновый цемент, быстро опустить стекла в 50%-ый формамид и отделить покровное стекло;
  - ii) отмывать препараты в 2 x SSC в течение 5 минут при температуре 37°C;

- iii) отмывать препараты 2 раза в 50%-ом формамиде при температуре 37°C в течение 5 минут каждый;
  - iv) отмывать препараты в 2 х SSC в течение 5 минут при температуре 37°C;
  - v) отмывать препараты в промывочном растворе Tween (0,05% в 2 х SSC) в течение 5 минут при температуре 37°C;
  - vi) нанести каплю DAPI/заливочной среды, защищающей от обесцвечивания, на покровное стекло и накрыть им препарат.
- 7) Препараты можно хранить при комнатной температуре в темноте или сразу же выполнять подсчет под флуоресцентным микроскопом.

#### IV-3 МИКРОЯДЕРНЫЙ ЦИТОМНЫЙ ТЕСТ С БЛОКИРОВАНИЕМ ЦИТОКИНЕЗА (CBMN Cyt) ДЛЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ЛИМФОЦИТОВ.

Недавно был опубликован подробный протокол анализа CBMN Cyt [1]. Полную фотогалерею различных типов клеток, подсчитанных при помощи анализа CBMN Cyt, см. в работе Фенеха и др. [3].

#### IV-4 ВЫЧИСЛЕНИЕ ОШИБКИ ИНДЕКСА ДЕЛЕНИЯ ЯДЕР (NDI) ДЛЯ CBMN-ТЕСТА

Для вычисления индекса деления ядер (NDI) и дисперсии NDI (для микроядерного теста) используются формулы, приведенные в Разделе 12.4.3:

$$NDI = \frac{(M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)}{N} \quad (IV-1)$$

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (IV-2)$$

В Таблице IV-1 представлен учебный пример для вычисления NDI и дисперсии.

ТАБЛИЦА IV-1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОЯДЕР

| Число клеток с 1, 2, 3 или 4 микроядрами |             |             |           |           |       |
|--|-------------|-------------|-----------|-----------|-------|
| N  | 1           | 2           | 3         | 4         | NDI   |
| 500                                      | 169±111,878 | 239±124,758 | 48±43,392 | 44±40,128 | 1,934 |

В Таблице IV-1 показано число клеток с 1, 2, 3 или 4 микроядрами при общем числе 500 клеток. NDI вычислен в соответствии с Ур. (IV-1) выше:

$$NDI = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) / 500 = 1,934$$

Значения дисперсии для каждого значения вычислены при использовании двучленного уравнения (Ур. IV-3):

$$\text{var}(M_1) = N(M_1 / N)(1 - (M_1 / N)) \quad (IV-3)$$

Таким образом, для  $M_1$ :

$$\text{var}(M_1) = 500 (169 / 500) (1 - (169 / 500)) = 111,878$$

*Примечание:* Следует отметить, что все приведенные здесь числа вычислены в Microsoft Excel со значениями, правильными до большого количества десятичных разрядов. Однако значения, представленные в тексте, для удобства были округлены до трех десятичных разрядов, и поэтому при использовании калькулятора для представленных значений результаты не будут точно такими же.

Для вычисления  $\text{var}(\text{NDI})$  необходимо сначала вычислить произведение суммы квадрата каждого значения  $M_i$  и его дисперсии:

$$\sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \quad (\text{IV-4})$$

Однако поскольку ковариацию можно правильно вычислить лишь от общего количества клеток при  $M =$  от 1 до 4, необходимо в уравнении заменить  $M$  на следующие значения  $M'$ :

ТАБЛИЦА IV-2. РАСЧЕТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ  $M_i$  и  $\text{VAR}(M_i)$

| N   | Значения $M_i$ для Ур. (IV-2) |                   |                   |                   |
|-----|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|     | 1                             | 2                 | 3                 | 4                 |
| 967 | $169 \pm 139,464$             | $478 \pm 241,719$ | $144 \pm 122,556$ | $176 \pm 143,967$ |

Значения  $M$  были повторно вычислены таким образом, чтобы  $M_1' = 1 \times 169$ ;  $M_2' = 2 \times 239$ ;  $M_3' = 3 \times 48$  и  $M_4' = 4 \times 44$ . Значение  $n$  является суммой этих компонентов, которая вычисляется следующим образом:

$$n = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) = 967$$

Значения дисперсии были повторно вычислены согласно Ур. (IV-3), но с использованием новых значений  $M_i'$  и  $n$ , например:

$$\text{var}(M_2') = 967 \times (478 / 967) \times (1 - (478 / 500)) = 241,719$$

Далее можно использовать значения  $M_i$  и  $\text{var}(M_i)$  из Таблицы IV-2 для вычисления первой части  $\text{var}(\text{NDI})$ , как дано в Ур. (IV-4):

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \\ &= M_1^2 \times \text{var}(M_1) + M_2^2 \times \text{var}(M_2) + M_3^2 \times \text{var}(M_3) + M_4^2 \times \text{var}(M_4) \\ &= (169^2 \times 139,464) + (478^2 \times 241,719) + (144^2 \times 122,556) + (176^2 \times 143,967) \\ &= 66\,212\,947,630 \end{aligned}$$

Затем, согласно Ур. (IV-1), необходимо найти ковариацию каждого набора данных. Она вычисляется согласно формуле:

$$\text{cov}(M_i', M_j') = -np_i p_j \quad (\text{IV-5})$$

В этом уравнении  $p_i$  и  $p_j$  - вероятность наблюдения каждого числа микроядер в двухядерных клетках, и, таким образом, для диапазона  $M_1 - M_4$ , вероятность вычислена следующим образом:

$$\begin{aligned} p_1 &= 169 / 967 = 0,175 \\ p_2 &= (2 \times 239) / 967 = 0,494 \\ p_3 &= (3 \times 48) / 967 = 0,149 \\ p_4 &= (4 \times 44) / 967 = 0,182 \end{aligned}$$

Таким образом, ковариацию  $M_1'$  и  $M_2'$  вычисляют согласно Ур. (IV-5):

$$\text{cov}(M_1', M_2') = -967 \times 0,175 \times 0,494 = -83,539$$

Тогда значения ковариации необходимо вычислить аналогичным образом для каждого набора  $M_i'$ ,  $M_j'$ :

$$\begin{aligned} \text{cov}(M_1', M_3') &= -967 \times 0,175 \times 0,149 = -25,166 \\ \text{cov}(M_1', M_4') &= -967 \times 0,175 \times 0,182 = -30,759 \\ \text{cov}(M_2', M_3') &= -967 \times 0,494 \times 0,149 = -71,181 \\ \text{cov}(M_2', M_4') &= -967 \times 0,494 \times 0,182 = -86,999 \end{aligned}$$

$$\text{cov}(M_3, M_4) = -967 \times 0,149 \times 0,182 = -26,209$$

После этого необходимо вычислить отдельные компоненты второй половины Ур. (IV-2). Например, для  $i = 1$  и  $j = 2$ :

$$M_1 \cdot M_2 \cdot \text{cov}(M_1, M_2) = 169 \times 478 \times (-83,539) = -6748429,704$$

Аналогично, чтобы получить суммы для  $i = \text{от } 1 \text{ до } 4$  и  $j = i+ \text{от } 1 \text{ до } 4$ :

$$M_1 \cdot M_3 \cdot \text{cov}(M_1, M_3) = 169 \times 144 \times (-25,166) = -612\,451,806$$

$$M_1 \cdot M_4 \cdot \text{cov}(M_1, M_4) = 169 \times 176 \times (-30,759) = -914\,897,142$$

$$M_2 \cdot M_3 \cdot \text{cov}(M_2, M_3) = 478 \times 144 \times (-71,181) = -4\,899\,528,670$$

$$M_2 \cdot M_4 \cdot \text{cov}(M_2, M_4) = 478 \times 176 \times (-86,999) = -7\,319\,049,001$$

$$M_3 \cdot M_4 \cdot \text{cov}(M_3, M_4) = 144 \times 176 \times (-26,209) = -664\,238,196$$

После вычисления всех отдельных компонентов их можно суммировать согласно второй половине Ур. (IV-2), что дает в итоге  $-21\,158\,594,519$ . В соответствии с Ур. (IV-2), дисперсия NDI составляет:

$$\text{var}(\text{NDI}) = 66\,212\,947,630 + 2 \times (-21\,158\,594,519) = 23\,895\,758,592$$

Чтобы преобразовать это в нормированное значение стандартной ошибки (SE), для представления со значением NDI, используется следующее уравнение:

$$SE(\text{NDI}) = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n^{3/2}} \quad (\text{IV-6})$$

Используя значения, вычисленные выше, получаем стандартную ошибку:

$$SE(\text{NDI}) = (23\,895\,758,592)^{(1/2)} / 967^{(3/2)} = 0,163$$

Таким образом, при использовании данных, представленных в Таблице IV-1, вычисленное значение NDI составляет  $1,934 \pm 0,163$ .





## Приложение V

### КРИТЕРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА

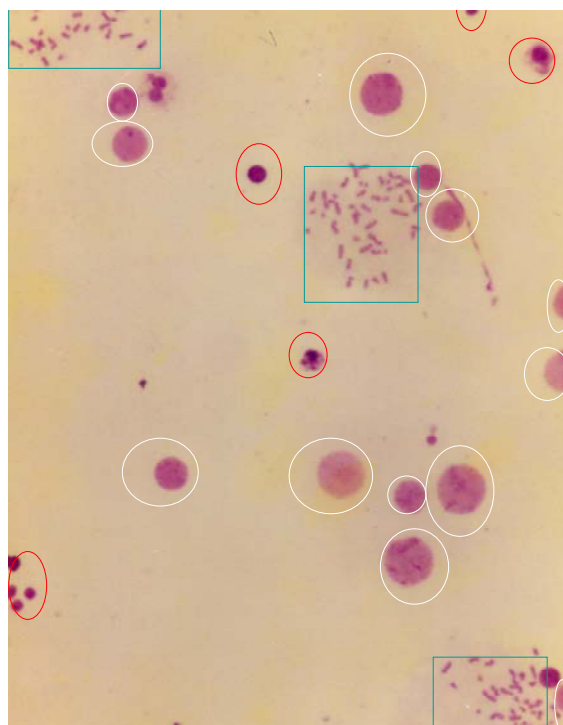
Процедура определения митотического индекса для анализа дицентриков состоит в следующем:

- Исключить ядра полиморфноядерных клеток, нестимулированных клеток (малые ядра), мертвых или умирающих клеток и микроядра.
- Подсчитать число ядер митотических клеток и стимулированных клеток (бластные клетки с большими ядрами) и использовать Ур. (V-1) для вычисления митотического индекса в стимулированных клетках.

С учетом диапазона размеров ядер стимулированных клеток, необходимо ввести произвольную отсечку между малыми стимулированными ядрами и нестимулированными ядрами. «Метафазные препараты» будут включать профазы и анафазы.

$$\text{Митотический индекс} = \frac{(\# \text{ метафазы}) \times 100}{\# \text{ метафазы} + \text{бласты}} \quad (\text{V-1})$$

На Рис. V-1 митотический индекс будет  $(3 / (3+12)) \times 100 = 20 \%$ , хотя для полного анализа митотического индекса, как правило, подсчитывают 500 клеток.



*РИС. V-1. Типовой препарат культуры лимфоцитов, вид со слабым увеличением. Белые круги – ядра, подсчитанные как бласты, красные круги – неподсчитанные ядра, квадраты – метафазные пластинки.*



## Приложение VI

### СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Примеры вычислений с использованием статистических процедур анализа и интерпретации цитогенетических биологических дозиметрических данных были представлены в настоящей публикации выше, в основном в Разделах 8 и 9. Имеется широкий выбор доступных учебников статистики, ряд которых специально ориентирован на биологические и биомедицинские применения. Поэтому настоящая публикация не предназначена для детального рассмотрения статистических методов. Тем ни менее, в данном Приложении дается краткое введение в методы статистического контроля и функции распределения, наиболее часто встречающиеся в области цитогенетической биологической дозиметрии. В Части 3 данного Приложения приводится стандартная компьютерная программа для подбора кривых доза-эффект.

#### VI-1. ОСНОВНЫЕ СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ЦИТОГЕНЕТИКЕ

##### VI-1.1. Стандартная ошибка и стандартное отклонение

Стандартное отклонение (SD) выборки данных - это просто мера средней дисперсии (расстояния) отдельных значений выборки от ее среднего значения. Оно дает представление о том, насколько широко разбросаны значения в выборке данных.

Стандартная ошибка среднего значения (SEM) является мерой наиболее вероятного отклонения среднего значения выборки от истинного среднего значения данной популяции. Она равнозначна оценке стандартного отклонения ошибки используемого метода. SEM дает количественное выражения того, насколько точно известно истинное среднее значение популяции. SEM уменьшается с возрастанием размера выборки, поскольку среднее значение большой выборки имеет гораздо большую вероятность быть ближе к истинному среднему значению популяции, чем среднее значение малой выборки.

##### VI-1.2. Значения $p$

Значение  $p$  характеризует вероятность получения результата, по крайней мере, столь же экстремального, как и данное значение выборки, предполагая, что это значение было получено случайным образом. Например, в случае принятия нулевой гипотезы о том, что средние значения двух популяций одинаковы, значение  $p=0,03$  означало бы, при условии справедливости нулевой гипотезы, 3%-ю вероятность наблюдения такого же различия, как измеренное. Взятие случайных выборок из идентичных популяций приведет в 97% экспериментов к меньшему различию, чем измеренное, и в 3% экспериментов к большему различию, чем измеренное.

Согласно статистическим исследованиям, если  $p$  превышает уровень значимости (часто 0,05), данные не отклоняются значительно от ожидаемой модели и таким образом нулевая гипотеза не может быть отклонена. Важно отметить, что в вышеприведенной ситуации любое утверждение о 95%-ной достоверности того, что неизвестное истинное значение параметра содержится в интервале, определенном границами доверительного интервала на самом деле означает, что этот интервал был определен при помощи процедуры, которая в 95% случаев дает правильные результаты.

В случае многократных сравнений значение  $p$  должно быть скорректировано следующим образом: для ряда независимых нулевых гипотез  $N$  вероятность случайного получения одного или нескольких значений  $p$  меньших, чем пороговое  $t = 0,05$  равно  $100(1,00 - 0,95^N)$ . Порог, необходимый для гарантии, что суммарный риск неправомерного отклонения истинной нулевой гипотезы составляет  $\leq 0,05$ , равен  $1,00 - 0,95^{(1/N)}$ .

### **VI-1.3. Критерий Хи-квадрат**

Критерий Хи-квадрат (остаточное отклонение или остаточная сумма квадратов отклонений ( $\chi^2$  Пирсона)) используется для того, чтобы оценить статистически значимые различия между значениями нормально распределенных результатов. Значение  $p$  для  $\chi^2$  (с соответствующим количеством степеней свободы) указывает на вероятность того, что различия между результатами обусловлены случайными причинами. Обычно устанавливается уровень значимости в 95%, что означает, что для нормально распределенной выборки данных можно ожидать такую степень изменчивости в течение не более 5% времени.

Критерий Хи-квадрат для однородности позволяет сравнивать ряд измерений путем проверки нулевой гипотезы о том, что относительные частоты наблюдаемых событий подчиняются распределению Хи-квадрат. В цитогенетике критерий Хи-квадрат для однородности используется для проверки наличия различий между несколькими выборками данных, например, наблюдаемым числом дицентриков в подсчитанных клетках, с целью определения числа значимо различных популяций, содержащихся в рассматриваемой выборке данных.

В общем случае, критерий Хи-квадрат надежен лишь для размера выборок свыше  $\sim 5$ . При выборке меньшего размера, для уменьшения ошибки, вызванной аппроксимацией данных к распределению Хи-квадрат, можно использовать поправку Йейтса. Поправка уменьшает количественные значения Хи-квадрат, увеличивая таким образом соответствующие значения величины  $p$ . Однако применимость этой поправки меняется от случая к случаю, а ее значение может быть слишком большим, так что ее рекомендуется применять с осторожностью.

В особом случае сравнения двух выборок может ожидаться биномиальное распределение данных. В этом случае значения  $\chi^2$  вычисляются путем нормальной аппроксимации биномиального распределения, что соответствует критерию Хи-квадрат при одной степени свободы. Биномиальная версия критерия Хи-квадрат может использоваться для сравнения одной выборки наблюдаемых и ожидаемых значений, например, количества дицентриков в контрольной, не подвергавшейся облучению, пробе крови с их количеством в облученной пробе крови.

### **VI-1.4. t - критерий**

Критерий  $t$  представляет собой метод проверки статистических гипотез, при котором нулевая гипотеза считается верной, если значение  $t$ -критерия подчиняется  $t$ -распределению. Критерий эффективен для небольших выборок, для которых популяция не может считаться нормально распределенной, поскольку стандартное отклонение популяции является неопределенным. Критерий  $t$  учитывает влияние вероятности путем учета информации о размере выборки. В цитогенетике  $t$ -критерий обычно используется для того, чтобы проверить значимость различия между двумя выборками, подчиняющимися распределению Пуассона, путем сравнения средних значений выборок для выяснения того, относятся ли эти выборки к одной популяции. Опять-таки, для того, чтобы определить, значимы ли различия между выборками, используется  $p$ -значение, при этом обычно устанавливается уровень значимости в 95% или 0,05.

Имеется целый ряд различных форм t-критерия, которые применимы в различных ситуациях. Парный t-критерий используется для зависимых выборок. Примером этого может быть количество дицентриков, подсчитанное двумя различными специалистами на одном и том же наборе препаратов. Для парного t-критерия размеры двух выборок, например, количество подсчитанных клеток, должны всегда быть одинаковыми. Двухвыборочный t-критерий предназначен для независимых выборок данных, например, количества дицентриков, подсчитанных двумя различными специалистами на двух различных наборах препаратов. В этом случае длины двух выборок могут быть одинаковыми или различающимися. Критерий t может быть одно- или двухсторонним. Односторонний критерий используется для того, чтобы определить, является ли одна выборка значимо большей, чем другая. Двухсторонний критерий применяется для определения того, является ли различие между выборками данных значимыми в обоих направлениях, то есть, что выборка номер один больше или меньше, чем выборка номер два.

### **VI-1.5. F-критерий**

F-распределение представляет собой непрерывное распределение вероятности, которое эквивалентно отношению двух распределений Хи-квадрат. F-критерий, основанный на этом распределении, может, таким образом, использоваться для сравнения данных с целью определения, относятся ли они к одному и тому же распределению. F-критерий или z-критерий могут использоваться для проверки значимости коэффициентов, полученных при подборе кривой методом наибольшего правдоподобия. В случае, если имеются свидетельства недостаточности степени аппроксимации (например, полученные на основе критерия  $\chi^2$ ), для проверки значимости коэффициентов должен использоваться F-критерий. В отличие от t-критерия, который используется для сравнения средних значений, F-критерий позволяет сравнивать дисперсию выборок данных. Наиболее часто F-критерий используется в методиках дисперсионного анализа.

### **VI-1.6. Дисперсионный анализ**

Дисперсионный анализ включает в себя набор нескольких методов, которые используются для проверки равенства средних значений. F-распределение применяется в дисперсионном анализе для того, чтобы проверить различия между тремя или более группами независимых, нормально распределенных данных с однородной дисперсией, или между повторными измерениями. Дисперсионный анализ оценивает важность одного или более факторов путем сравнения средних значений зависимой переменной при различных значениях фактора.

Значение p для каждого фактора описывает вероятность того, что высокая дисперсия между группами по сравнению с изменением внутри групп является случайной. Значение p может считаться вероятностью того, что процесс случайного отбора данных приведет к средним значениям, отличающимся друг от друга в такой же или большей степени, чем наблюдается в эксперименте.

В цитогенетике дисперсионный анализ может использоваться в любых случаях, когда требуется сравнить три или более группы или два или более фактора. Это может быть, например, в случае исследования совместных эффектов уровня дозы излучения и фракционирования дозы или радиационного облучения и химического воздействия. Существует большое количество различных форм критерия, но у большинства коммерчески доступных пакетов обработки данных имеются возможности дисперсионного анализа, а дальнейшие инструкции можно найти в литературе по статистике.

Хотя в принципе дисперсионный анализ является параметрическим методом анализа, который, как правило, можно применять только к данным с нормальным распределением, тип распределения данных, с которым наиболее часто сталкиваются в цитогенетике (а именно, распределение Пуассона), в достаточной мере близок к нормальному, чтобы обеспечивать

возможность применения дисперсионного анализа. В противном случае можно использовать большое количество непараметрических методов анализа, которые описаны ниже.

### **VI-1.7. Непараметрические критерии**

В случаях, когда условие нормальности распределения совокупности невозможно, могут быть применены непараметрические критерии. Критерий Уилкоксона представляет собой непараметрический критерий, аналогичный парному t-критерию. Он может использоваться для сравнения одной или двух выборок данных. Это критерий знаковых рангов и, как таковой, требует, чтобы данные были измерены через повторяющиеся интервалы. Статистика критерия оценивает равенство медиан популяций. Для независимых выборок можно использовать критерий Манна-Уитни. Это непараметрическая версия t-критерия, которую можно использовать для проверки того, относятся ли две выборки непарных данных к одному и тому же распределению. Для сравнений многомерных выборок данных подходит критерий Краскела-Уоллиса, представляющий собой расширенный критерий Манна-Уитни, аналогичный дисперсионному анализу.

## **VI-2. СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ**

Существует несколько форм и классов распределений, которые можно использовать для моделирования вероятности возникновения событий. Тип выбранного распределения очень важен для точного анализа данных, и для оценки цитогенетических данных были предложены и применяются несколько моделей. Ниже рассмотрен набор обычно используемых моделей и их применимость в радиационной цитогенетике.

### **VI-2.1. Распределение Пуассона**

Распределение Пуассона представляет собой дискретное распределение вероятности, описывающее вероятность возникновения редких случайных событий. Распределение Пуассона – это наиболее широко признанный и обычно используемый при цитогенетическом анализе данных тип распределения. Данные о хромосомных aberrациях обычно довольно малочисленны, и Эдвардс и др. показали, что намного более реалистично предположить, что хромосомные aberrации подчиняются распределению Пуассона, а не нормальному распределению [4]. Меркл показал, что основанные на распределении Пуассона критерии согласия, включая  $\chi^2$ , дисперсию и u-тест, рассматриваемые в настоящей публикации, применимы к цитогенетическим данным, особенно при большом размере выборок [5]. Как было показано, при подборе кривой регрессионный анализ применим для данных, имеющих пуассоновское распределение. Формы кривых, получающиеся в результате применения методов наибольшего правдоподобия [6] и/или взвешенных наименьших квадратов [7] теперь почти повсеместно используются для подбора основанных на дозах калибровочных кривых для хромосомных aberrаций, таких как дицентрики или микроядра.

### **VI-2.2. Биномиальное распределение**

Биномиальное распределение – это дискретное распределение вероятности, которое описывает вероятность количества успешных результатов при выполнении последовательности независимых экспериментов, каждый из которых имеет один из двух возможных исходов. В каждом случае, если у результата 1 есть связанный с ним уровень вероятности  $p$ , то у результата 2 будет вероятность  $1 - p$ . В цитогенетике хорошим примером ряда данных, который может быть смоделирован с помощью этого распределения, является подсчитанное число поврежденных клеток, где два «биномиальных» результата – это поврежденное или неповрежденное состояние клетки. Действительно, биномиальное распределение часто используется для вычисления стандартных ошибок, связанных с выходом поврежденных клеток.

### **VI-2.3. Смешанная пуассоновская модель**

В попытке справиться с проблемой неправильной оценки средней дозы, вызванной влиянием неоднородности данных, Сасаки [8] предложил методику анализа данных о хромосомных aberrациях. Популяция клеток состоит из смеси субпопуляций, каждая из которых облучена различной дозой, что вызывает различное количество повреждений. Таким образом, распределение хромосомных повреждений в клетках может быть выражено через смешанное распределение Пуассона, а его «развертка» создает профиль распределения дозы. Было продемонстрировано, что эта модель обеспечивает адекватную линейно-квадратичную аппроксимацию зависимости доза-эффект для моделируемых и реальных данных.

### **VI-2.4. Отрицательное биномиальное распределение**

Как и распределение Пуассона, отрицательное биномиальное распределение представляет собой дискретное распределение вероятности, однако у отрицательного биномиального распределения имеется дополнительный параметр, который может использоваться для характеристики избыточной дисперсии. По мере того, как параметр избыточной дисперсии стремится к 0, отрицательное биномиальное распределение стремится к распределению Пуассона [9]. Отрицательное биномиальное распределение использовалось несколькими авторами вместо распределения Пуассона, например в предпринятом в 2008 году исследовании частоты перемещений пилотов в авиакомпании [10].

### **VI-2.5. Распределение Неймана типа А**

Распределение Неймана было впервые предложено в 1939 г. Нейманом, который ввел этот новый класс распределения, предназначенный для проверки различия между средними значениями двух выборок с различной дисперсией. Это отличает его от процедур проверки гипотез с помощью других стандартных критериев, таких как, например, z-критерий и t-критерий, которые основаны на нормальном распределении данных с известными и неизвестными стандартными отклонениями в популяции, соответственно, и для которых значения дисперсии должны быть подобными, если не идентичными. С увеличением размера выборки распределение Неймана типа А стремится к обобщенному распределению Пуассона [11]. В 2008 г. Морон и др. опубликовали техническую записку с описанием компьютерной программы NETA, которую можно использовать для вычисления 95%-ого доверительного интервала для событий, подчиняющихся распределению Неймана типа А [12]. Морон и его коллеги определили, что доверительные интервалы, рассчитанные при использовании распределения Неймана, были меньше, чем вычисленные традиционным методом, основанным на распределении Пуассона, для выборок малого размера (числа клеток) [12].

### **VI-2.6. Другие распределения**

Бета-распределение обозначает семейство непрерывных распределений вероятности, которые определены на интервале 0–1 двумя параметрами формы, обычно называемыми  $\alpha$  и  $\beta$ . Распределения Дирихле представляют собой расширение Бета-распределения для многопараметрического случая ( $> 2$  параметров). Стирателли и др. [13] сравнил распределение Пуассона и биномиальное распределение для химически индуцированного повреждения хромосом с бета-биномиальным, отрицательным биномиальным и коррелированным биномиальным распределениями. В отличие от распределения Пуассона и простых биномиальных распределений, эти модели не предполагают независимость от реакции клеток. Проведя проверку по критерию  $\chi^2$ , авторы обнаружили, что все модели, основанные на бета-распределении, давали лучшую аппроксимацию по сравнению с моделью Пуассона и биномиальной моделью. Наилучшую аппроксимацию имеющейся у авторов выборки данных обеспечивала бета-биномиальная модель [13].

Лог-нормальное распределение было формально описано Эйчисоном и Шеном в 1980 г. Логистическое преобразование d-мерного нормального распределения дает лог-нормальное распределение по d-мерному симплексу. Это распределение может быть применено в статистическом диагнозе, где классификация основных случаев носит неопределенный характер, как, например, в случае с данными о хромосомных aberrациях. Авторы дают примеры использования, например, в прямом статистическом описании и анализе композиционных и вероятностных данных, и также вместо сопряженного априорного распределения Дирихле в анализе данных, имеющих мультиномиальное распределение, и данных таблиц сопряженных признаков [14].

### VI-3. КОМПЬЮТЕРНАЯ ПРОГРАММА ПОДБОРА КРИВЫХ ДОЗА-ЭФФЕКТ

Программное обеспечение для подбора кривых было описано выше в Разделе 8.3. В данном Приложении представлен учебный пример, в котором используется одна из опций программного обеспечения, основанная на программных средствах R, применительно к данным для кобальта-60, приведенным в Таблице 4. В то время как программы SABAS и Dose Estimate являются доступными готовыми продуктами, для реализации процедуры R требуется компьютерная программа, разработанная математиком. Необходимая программа была разработана (Х. Бразелманом) и представлена здесь на вставке 1 полностью, поскольку ранее она нигде не публиковалась.

Программа состоит из четырех частей. Первая используется для ввода наблюдаемых данных, то есть доз, количества aberrаций, количества подсчитанных клеток и индекса распределения (disp). Для задания индекса имеются два варианта; можно либо использовать постоянное значение для всех точек дозы, либо задавать каждой дозе индивидуальное значение. В учебном примере используется постоянное значение 1,0. В качестве альтернативы, которая также приведена, можно использовать индивидуальные значения  $\sigma^2/y$ , показанные в Таблице 4. (Следует отметить, что все строки в программе, начинающиеся с символа #, предназначены только для информации и не выполняются как программа). Следующая часть программы предназначена для ввода оптимальных параметров настройки: i) коэффициента корреляции сигма, для которого рекомендуется использовать значение 1 или как-то иначе оценить этот коэффициент; ii) необходимого веса; iii) функции для подбора кривой. Для этого ввести либо «l» для линейного подбора или «lq» для линейно-квадратичного подбора. Остальные две части программы должны модифицироваться лишь авторами программы. При желании аппроксимировать данные линейной функцией зависимости доза-эффект, данные, которые необходимо ввести, используя данные о гелии-4 из Таблицы 4, приведены под вставкой 1. В остальном программа идентична приведенной на вставке 1.

Для запуска программы необходимо загрузить программу R с интернет-сайта (см. Раздел 8.3). Используя PDF-версию этой публикации, скопировать и вставить в текстовый редактор Word программу, приведенную на вставке 1. Заменить входные данные о кобальте-60 из учебного примера на ваши собственные данные и выбрать требуемую опцию, «l» или «lq». Сохраняя программу R на вашем экране, вставить скопированный фрагмент программы после символа >.

Результаты расчетов даны на вставке 2, где  $x_0$ ,  $x_1$  и  $x_2$  являются коэффициентами C,  $\alpha$  и  $\beta$ , соответственно, как показано в Уравнении (2), вместе с их стандартными ошибками. Значение z – это критерий значимости каждого коэффициента с его вероятностью (Pr). Также показаны значения дисперсии и ковариации для каждого коэффициента. Можно отметить, что значения коэффициентов идентичны приведенным в Таблице 5, а значения дисперсии/ковариации идентичны приведенным в Разделе 9.7.3. Результаты расчетов по программе R также представляются графически в виде точек данных и аппроксимирующей их кривой (Рис. VI-1).



## ВСТАВКА 1. ПРОГРАММА ПОДБОРА КРИВОЙ, ИСПОЛЬЗОВАННАЯ В УЧЕБНОМ ПРИМЕРЕ ДЛЯ ДАННЫХ ПО <sup>60</sup>СО

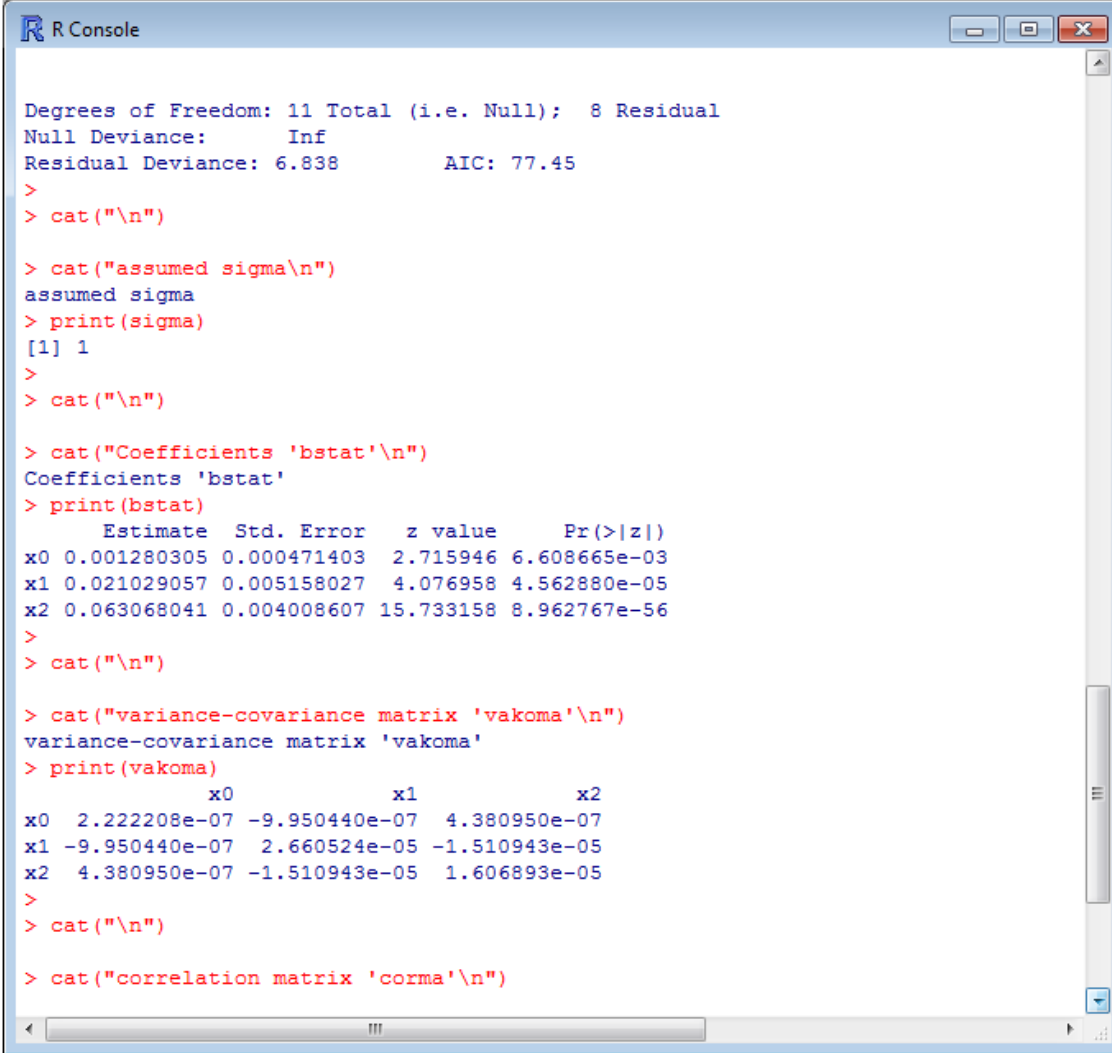
```
## latest changes: H. Braselmann, 2010, April 9th
##           Helmholtz Zentrum München, Department of Radiation Cytogenetics, Germany
## contact details: braselm@helmholtz-muenchen.de
## user part: data
# cobalt-60 gamma (86)
dose<-c(0,0.1,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,5)
ab<-c(8,14,22,55,100,109,100,103,108,103,107)
cells<-c(5000,5002,2008,2002,1832,1168,562,332,193,103,59)
disp<- 1.0
#disp<- c(1.0,1.0,1.08,0.97,1.03,1.0,1.06,1.14,0.83,0.88,1.15)
## user part: option settings
sigma<- 1 # regression sigma 1 or
#sigma<- NULL # NULL (regression sigma estimated)
wt<- 1/disp # weight setting, required!
model<- "lq"
#model<- "l"
# "l" for linear or "lq" for linear quadratic
# a background value (c) is fitted in both options
#####
## execution part: changes recommended only for developers of the script ##
#####
if (length(disp)==1) disp<- rep(disp,length(dose))
kurvendaten<-data.frame(dose,ab,cells,disp)
print(kurvendaten)
x0<-cells
x1<-cells*dose
x2<-cells*dose*dose
modelldaten<-list(x0,x1,x2,ab)
if (length(wt)==1) wt<- rep(wt,length(dose))
if (model=="lq" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="lq" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
smry<-summary(result,correlation=TRUE)
#smry$coefficients
#smry$correlation
corma<-smry$correlation
bstat<-smry$coefficients
seb<-bstat[,2]
vakoma<-corma*outer(seb,seb)
vakoma<-vcov(result)
#####
## output of results ##
#####
cat("\n")
cat("Result of curve fit 'result'\n")
cat("-----\n")
print(result)
cat("\n")
cat("assumed sigma\n")
print(sigma)
cat("\n")
cat("Coefficients 'bstat'\n")
print(bstat)
cat("\n")
cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
print(vakoma)
cat("\n")
cat("correlation matrix 'corma'\n")
print(corma)
par(lwd=2)
plot(dose, ab/cells)
```

```
if (model=="lq") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x+bstat[3,1]*x*x,0,max(dose), add=TRUE)
if (model=="l") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x,0,max(dose), add=TRUE)
```

Входные данные для подбора кривой по линейной модели применительно к  $^4\text{He}$ .

```
# 20 MeV helium  $\alpha$ - particles (87)
dose<-c(0,0.051,0.104,0.511,1.01,1.536,2.05,2.526,3.029)
ab<-c(3,19,27,199,108,96,120,148,108)
cells<-c(2000,900,1029,1136,304,142,137,144,98)
disp<- 1.19
sigma<- NULL
wt<- 1/disp
model<- "l"
```

ВСТАВКА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДБОРА КРИВОЙ ДЛЯ ДАННЫХ ПО  $^{60}\text{Co}$



```
R Console

Degrees of Freedom: 11 Total (i.e. Null); 8 Residual
Null Deviance:      Inf
Residual Deviance: 6.838      AIC: 77.45
>
> cat("\n")

> cat("assumed sigma\n")
assumed sigma
> print(sigma)
[1] 1
>
> cat("\n")

> cat("Coefficients 'bstat'\n")
Coefficients 'bstat'
> print(bstat)
      Estimate Std. Error  z value    Pr(>|z|)
x0 0.001280305 0.000471403  2.715946 6.608665e-03
x1 0.021029057 0.005158027  4.076958 4.562880e-05
x2 0.063068041 0.004008607 15.733158 8.962767e-56
>
> cat("\n")

> cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
variance-covariance matrix 'vakoma'
> print(vakoma)
           x0           x1           x2
x0 2.222208e-07 -9.950440e-07 4.380950e-07
x1 -9.950440e-07 2.660524e-05 -1.510943e-05
x2 4.380950e-07 -1.510943e-05 1.606893e-05
>
> cat("\n")

> cat("correlation matrix 'corma'\n")
```

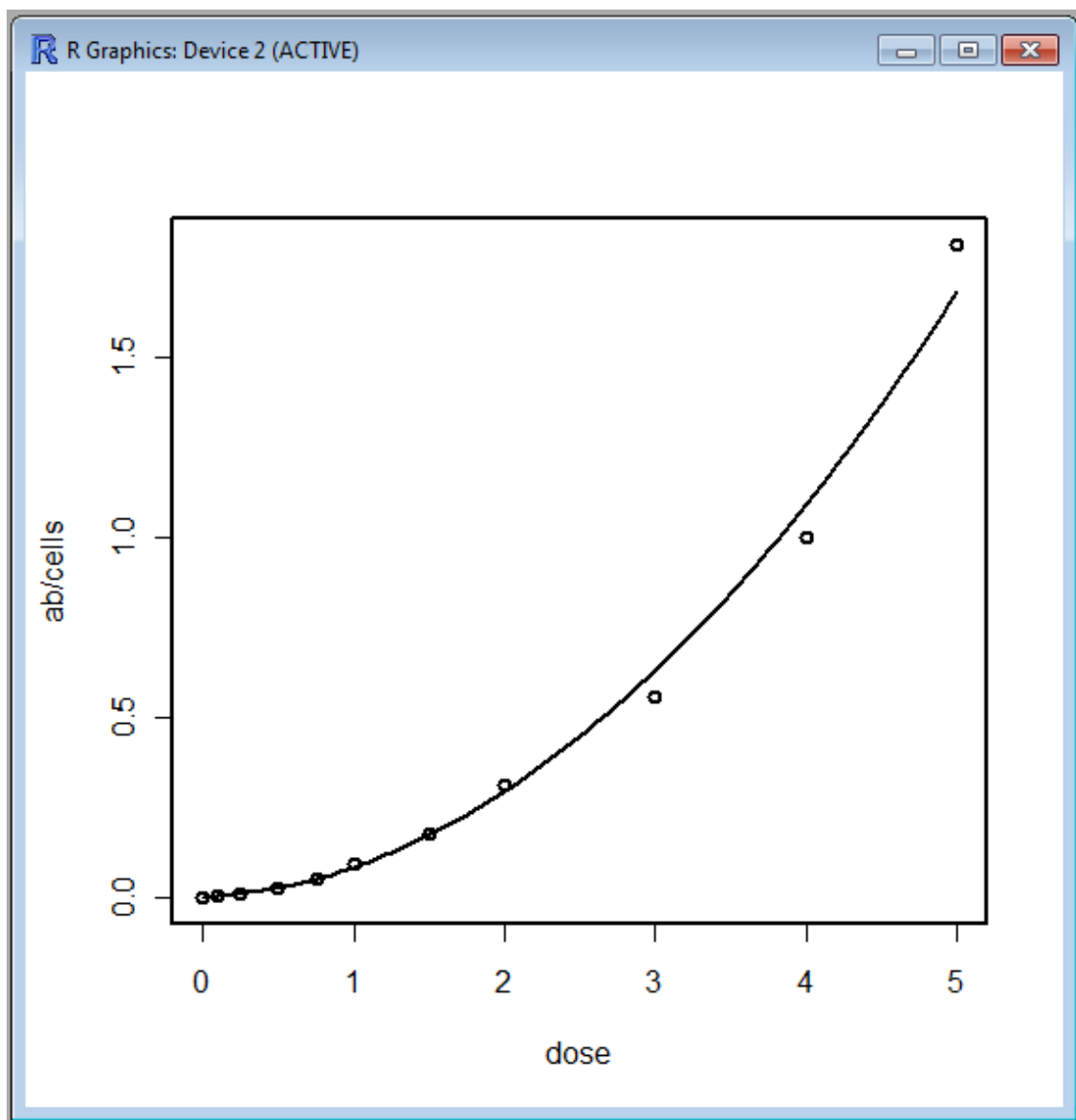


РИС. VI-1. Результат для данных по  $^{60}\text{Co}$ , представленный в виде графика, показывает наблюдаемые точки данных и подобранную линейно-квадратичную кривую.



## Приложение VII

### ПРИМЕР МЕЖЛАБОРАТОРНОГО СРАВНЕНИЯ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА АНАЛИЗОВ

В данном Приложении приводится пример международного межлабораторного сравнения, выполненного 14 лабораториями биологической дозиметрии. Работа включала анализ предметных стекол с метафазными препаратами крови, облученной *in vitro* гамма-излучением  $^{60}\text{Co}$  с дозой 0,75 и 2,5 Гр. Участвующие лаборатории должны были сообщать полученную ими частоту дицентриков и оценку дозы после анализа 50, 100 клеток (режим сортировки) и после обычного подсчета 500 клеток или остановки подсчета, если было достигнуто значение 100 дицентриков. Для этого межлабораторного сравнения показатели работы каждой лаборатории и воспроизводимость работы оценивались с использованием устойчивых методов (алгоритмы А и S), описанных в стандартах ISO 5725-5 и ISO 13528:2005 [15, 16].

В данном Приложении в качестве учебного примера показана лишь часть результатов межлабораторного сравнения, а именно, результаты, полученные после анализа 500 клеток с облучением 0,75 Гр. Детальное описание приведено в [17].

Для определения показателей работы лаборатории использовался z-критерий:

$$z = \frac{(x_i - x_{ref})}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \quad (\text{VII-1})$$

Для каждой лаборатории z-критерий учитывает сообщенные лабораторией значения частоты наблюдаемых дицентриков или оценку дозы, полученную при соотношении частоты дицентриков к уже имевшейся собственной кривой доза-эффект лаборатории ( $x_i$ ). Для анализа частоты значение  $x_{ref}$  согласовывалось по принципу консенсуса (устойчивое среднее  $x^*$ , полученное при помощи алгоритма А), а для анализа оценки дозы это была введенная физическая доза. Z-критерий также учитывает устойчивое стандартное отклонение ( $s^*$ ), полученное при помощи алгоритма А, и стандартную неопределенность консенсуса или базового значения ( $u_x$ ). После оценки частоты  $u_x$  было вычислено следующим образом:

$$u_{ref} = 1.25s^* / \sqrt{p} \quad (\text{VII-2})$$

где  $p$  - число участвующих лабораторий.

Применительно к оценке дозы, неопределенность, обозначенная как  $u_x$ , для физических измерений фактических доз, доставленных в пробы крови, считалась незначительной согласно критериям, приведенным в Ур. (VII-3):

$$0.96 \leq \frac{s^*}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \leq 1 \quad (\text{VII-3})$$

Для оценки показателей работы лаборатории использовались следующие критерии:

|               |                      |
|---------------|----------------------|
| $ z  \leq 2$  | удовлетворительный   |
| $2 <  z  < 3$ | сомнительный         |
| $ z  \geq 3$  | неудовлетворительный |

На Рис.VII-I представлен z-показатель для частоты дицентриков, полученный для каждой лаборатории. В этом случае устойчивое среднее, используемое в качестве  $x_{ref}$ , составляло 0,05, а  $s^*$  составляло 0,01. Все значения z оказались в диапазоне от -1,66 до 1,21, и, согласно критериям приемлемости, все были признаны «удовлетворительными».

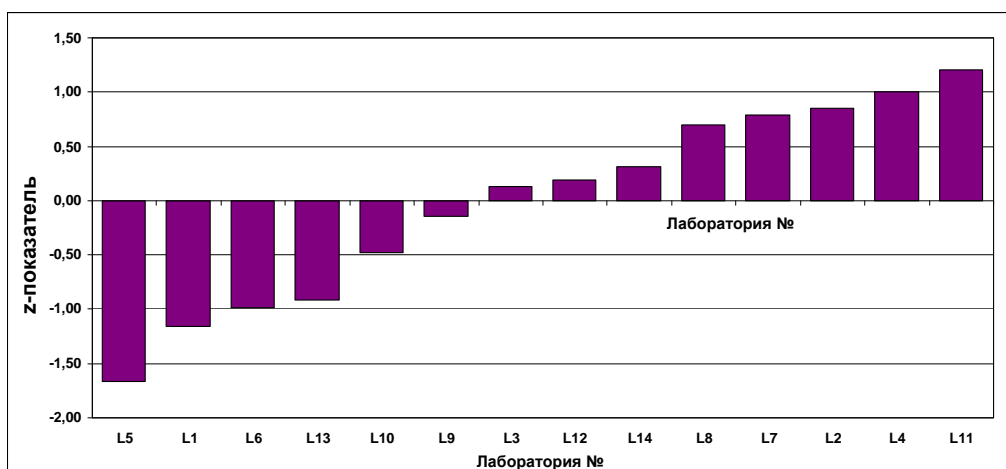


РИС.VII-1. Для частоты дицентриков z-показатель был получен для каждой участвующей лаборатории.

На Рис.VII-2 для каждой лаборатории показана сообщенная этой лабораторией оценка дозы с соответствующим 95%-ым доверительным интервалом. Сплошная горизонтальная линия представляет доставленную физическую дозу, а пунктирные линии отображают интервал  $1,96s^*$ . В этом случае по z-показателю оценку «сомнительно» получила лишь лаборатория L11, который сообщила оценку дозы 0,98 Гр (2.12).

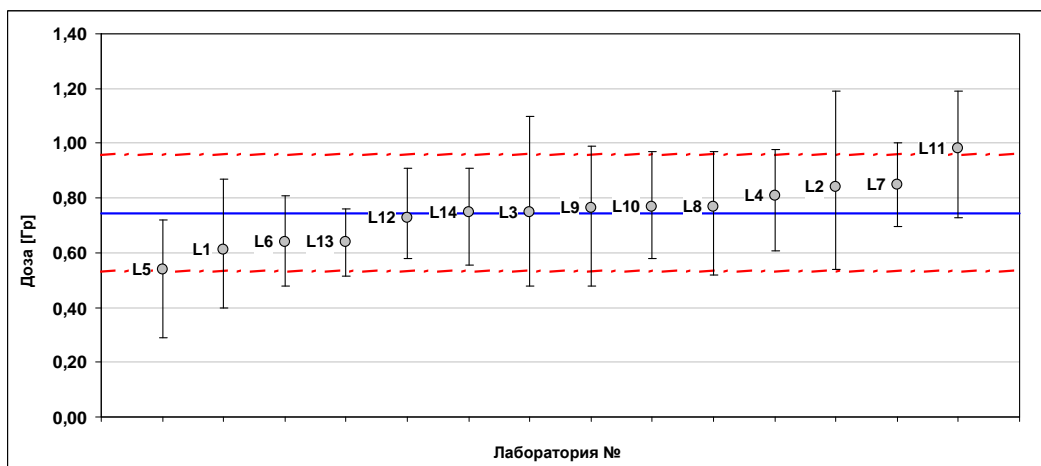


РИС. VII-1. Оценка доз каждой участвующей лаборатории.

Воспроизводимость выполненной работы была оценена по стандартному отклонению воспроизводимости ( $S_R$ ):

$$S_R = \sqrt{(s^*)^2 + S_r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} \quad (\text{VII-4})$$

Эта формула учитывает вариабельность между лабораториями через устойчивое стандартное отклонение ( $s^*$ ), полученное при использовании алгоритма А, а внутрилабораторную вариабельность через стандартное отклонение воспроизводимости ( $S_R$ ), полученную при использовании алгоритма S. В Ур. (VII-4)  $n$  представляет меру

повторяемости для каждой участвующей лаборатории, которая в данной работе была равна 2. После анализа 500 клеток с дозой 0,75 Гр значения ( $S_R$ ) составляли 0,013 для частоты и 0,116 для дозы. Для сравнения воспроизводимости обоих измерений, частоты и дозы, был определен вариационный коэффициент (CV).

Вариационный коэффициент (CV) указывает на глобальную дисперсию результатов, он вычисляется как отношение  $S_R/x^*$ . В данном примере полученные коэффициенты составляли 24,4% и 15,6% для частоты и дозы, соответственно. Эти результаты указывают на лучшую воспроизводимость оценки доз, а не частоты дицентриков.

В будущих межлабораторных сравнениях для тех же самых лабораторий будет определена возможность улучшения воспроизводимости. При невозможности ее улучшения полученное значение будет принято как вариабельность, связанная со случайными ошибками метода.





## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ДЛЯ ПРИЛОЖЕНИЙ

- [1] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [2] WEIER, H.G., et al., Two colour hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, *Chromosoma* **100** (1991) 371–376.
- [3] FENECH, M., et al., HUMN project: detailed description of the scoring criteria 4686 for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte 4687 cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [4] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [5] MERKLE, W., Poisson goodness-of-fit tests for radiation-induced chromosome aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **40** (1981) 685–692.
- [6] FROME, E.L., DUFRAIN, R.J., Maximum likelihood estimation for cytogenetic dose-response curves, *Biometrics* **42** (1986) 73–84.
- [7] PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R.K., “Curve fitting by maximum likelihood”, *Radiation-Induced Chromosomal Aberrations in Tradescantia: Dose Response Curves*, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 87–140.
- [8] SASAKI, M.S., Chromosomal biodosimetry by unfolding a mixed Poisson distribution: a generalized model, *Int. J. Radiat. Biol.* **79** (2003) 83–97.
- [9] BRAME, R. S., and GROER, P. G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident. *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
- [10] YONG, L.C., et al., Increased frequency of chromosome translocations in airline pilots with long-term flying experience, *Occ. Environ. Med.* **66** (2008) 56–62.
- [11] NEYMAN, J., On a new class of “contagious” distribution, applicable in entomology and bacteriology, *Am. Math. Stat.* **10** (1939) 35–55.
- [12] MORAND, J., et al., Confidence limits for Neyman type A-distributed events, *Radiat. Prot. Dosim.* **128** (2008) 437–443.
- [13] STIRATELLI, R.G., MCCARTHY, K.L., SCRIBNER, H.E., Parametric approaches to the analysis of in vivo cytogenetics studies, *Environ. Mutagen.* **7** Suppl. 4 (1985) S43–S54.
- [14] AITCHISON, J., SHEN, S.M., Logistic-normal distributions: some properties and uses, *Biometrika* **67** (1980) 261–272.
- [15] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method”, *International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results*, ISO 5725-5, ISO, Geneva (1998).
- [16] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, *International Standard. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons*, ISO 13528, ISO, Geneva (2005).
- [17] DI GIORGIO, M., BARQUINERO, J.F., VALLERGA, M.B., RADL, A., TAJA, M.R., SEOANE, A., DE LUCA, J., STUCK OLIVEIRA, M., VALDIVIA, P., GARCIA LIMA, O., LAMADRID, A., GONZALEZ MESA, J., ROMERO AGUILERA, I., MANDINA CARDOSO, T., GUERRERO CARBAJAL, Y.C., ARCEO MALDONADO, C., ESPINOZA, M.E., MARTINEZ-LOPEZ, W., MENDEZ-ACUÑA, L., DI TOMASO, M., ROY, L., LINDHOLM, C., ROMM, H., GÜÇLÜ, I., LLOYD, D.C., Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation through triage and routine mode results by robust methods. *Radiation Research* (2011, in press).



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|             |   |
|-------------|---|
| АТФ         | аденозинтрифосфат   |
| АЭС         | атомная электростанция  |
| БДУ         | бромдезоксимуридин  |
| ВИЧ         | вирус иммунодефицита человека                                   |
| ВОЗ         | Всемирная Организация Здравоохранения                           |
| ДАПИ        | 4', 6-диамидин-2-фенилиндола                                    |
| ДМСО        | диметилсульфоксид   |
| ДНК         | дезоксирибонуклеиновая кислота                                  |
| ИСО         | Международная организация по стандартизации                     |
| ИЯУ         | импровизированное ядерное устройство                            |
| ЛПЭ         | линейная передача энергии                                       |
| М1, М2, ... | Первая, вторая, ... метафаза деления <i>in vitro</i>            |
| МАГАТЭ      | Международное агентство по атомной энергии                      |
| МЕ          | международная единица   |
| МКРБИ       | Международная комиссия по радиологическим единицам и измерениям |
| МКРЗ        | Международная комиссия по радиационной защите                   |
| ОБЭ         | относительная биологическая эффективность                       |
| ОЛС         | острый лучевой синдром  |
| ООН         | Организация Объединенных Наций                                  |
| ПЗС         | прибор с зарядовой связью                                       |
| ПЦР         | полимеразная цепная реакция                                     |
| ПЭГ         | полиэтиленгликоль   |
| РДУ         | радиологическое дисперсионное устройство                        |
| РНаза       | рибонуклеаза  |
| ТЛД         | термолюминесцентный дозиметр                                    |
| УФ          | ультрафиолет  |

|          |   |
|----------|---|
| ФГА      | фитогемагглютинин   |
| ФПГ      | флюоресценция плюс окрашивание красителем Гимза   |
| ЭДТК     | этилендиаминтетрауксусная кислота   |
| ЭСР      | электронный спиновый резонанс   |
| ace      | ацентрический фрагмент  |
| AFRRI    | Научно-исследовательский институт радиобиологии<br>вооруженных сил США<br>Armed Forces Radiobiology Research Institute (USA)    |
| ANOVA    | дисперсионный анализ  |
| BN       | двухъядерный  |
| BSS      | базовые стандарты безопасности  |
| CABAS    | Компьютерная программа для вычисления хромосомных<br>аббераций<br>(Сокращение от «chromosomal aberration calculation software») |
| CBMN     | микроядерный тест с блокированием цитокинеза  |
| CBMN Cyt | микроядерный цитомный тест с блокированием цитокинеза   |
| CHO      | яичник китайского хомячка   |
| CP       | центромерный зонд   |
| CRP      | Программа координированных исследований<br>Co-ordinated Research Programme  |
| Cyt-B    | цитохалазин-B   |
| DCA      | анализ дицентрических хромосом  |
| DAPI     | 4', 6-диамидин-2-фенилиндол   |
| dic      | dicentric chromosome  |
| DSB      | двухнитевой разрыв  |
| FISH     | флуоресцентная гибридизация in situ   |
| FPG      | флюоресценция плюс окрашивание красителем Гимза   |
| HBSS     | сбалансированный солевой раствор Хенкса   |
| IRSN     | Институт радиационной защиты и ядерной безопасности<br>(Франция)  |
| LCL      | нижняя граница доверительного интервала   |
| LIMS     | система управления лабораторной информацией   |

|         |   |
|---------|---|
| MEM     | минимальная питательная среда   |
| mFISH   | многоцветная флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>   |
| MN      | микроядро (micronucleus)  |
| NBUD    | ядерная почка   |
| NDI     | индекс деления ядер   |
| NHEJ    | соединение негомологичных концов<br>(non-homologous end-joining)  |
| NER     | эксцизионная репарация ДНК<br>(nucleotide excision repair)  |
| NIRS    | Национальный институт радиологических исследований (Япония)   |
| NPB     | нуклеоплазматический мост   |
| PAINT   | Протокол идентификации аберраций и номенклатурной терминологии<br>(сокращение от «Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology») |
| PBS     | фосфатно-солевой буферный раствор   |
| PCC     | преждевременная конденсация хромосом  |
| QA      | обеспечение качества  |
| QC      | контроль качества   |
| REAC/TS | Центр помощи при радиационных аварийных ситуациях / Центр подготовки персонала<br>(Radiation Emergency Assistance Center/Training Site (USA))           |
| RICA    | экспресс-анализ интерфазных хромосом<br>(rapid interphase chromosome assay)   |
| SD      | стандартное отклонение  |
| SE      | стандартная ошибка  |
| SEM     | стандартная ошибка среднего   |
| СИ      | Международная система единиц (СИ)   |
| SSB     | однонитевой разрыв  |
| SSBR    | репарация однонитевого разрыва  |
| SSC     | цитратно-солевой буфер  |
| UCL     | верхняя граница доверительного интервала  |



## ОПРЕДЕЛЕНИЯ<sup>3</sup>

**авария (accident)\*.** Любое непреднамеренное событие, включая ошибки во время эксплуатации, отказы оборудования и другие неполадки, реальные или потенциальные последствия которого не могут игнорироваться с точки зрения защиты или безопасности.

**Авария с возникновением критичности.** Авария, связанная с критичностью.

- Как правило, на установке, в которой используется *делящийся материал*.

**аварийная ситуация\* (emergency).** Внештатная ситуация, которая требует принятия оперативных мер, прежде всего, для смягчения опасности или неблагоприятных последствий для здоровья человека и безопасности или качества жизни, собственности или окружающей среды. Этот термин охватывает ядерные и радиологические аварийные ситуации и обычные чрезвычайные ситуации, такие, как пожары, выход опасных химических веществ, бури или землетрясения. Сюда входят ситуации, в которых оперативные меры необходимы для смягчения эффектов воспринимаемой опасности. Аварийная ситуация, в которой имеется реальная или воспринимаемая опасность вследствие:

- а) энергии, выделяющейся в результате ядерной цепной реакции или распада продуктов цепной реакции; или
- б) радиационного облучения.
- Пункты а) и б) приблизительно характеризуют соответственно ядерные и радиологические аварийные ситуации. Однако они не отражают точное различие.
- Термин «радиационная аварийная ситуация» применяется в некоторых случаях, когда строго определенное различие в характере опасности является несущественным (например, национальный план мероприятий на случай радиационной аварии), и имеет по существу то же самое значение.

**альфа-излучение (alpha radiation).** Корпускулярное излучение, возникающее при радиоактивном распаде определенных радионуклидов. Альфа-частицы состоят из двух нейтронов и двух протонов и идентичны ядру атома гелия. Они легко поглощаются воздухом толщиной в несколько сантиметров, и поэтому основная опасность связана с внутренним инкорпорированием альфа-излучающих нуклидов.

**анеуген (aneugen).** Косвенный мутаген, способный воздействовать на клеточное деление и аппарат митотического веретена, вызывая потерю или появление целых хромосом, что приводит к анеуплоидии.

**анкилозирующий спондилит.** Хронический воспалительный артрит, поражающий позвоночник и подвздошно-крестцовое сочленение в тазовой области. Многие десятилетия назад для лечения воспаления позвоночника у этих пациентов использовалась наружная дистанционная лучевая терапия с большим полем.

**антикоагулянт.** Препарат, предотвращающий свертывание (коагуляцию) крови.

---

<sup>3</sup> Данные определения относятся к настоящей публикации. Определения, помеченные звездочкой, взяты из [357].

**ацентрик (acentric) (ace).** Терминальный или интерстициальный фрагмент хромосомы переменного размера, не имеющий центромеры. Ацентрик, образующийся независимо от дицентрической, трицентрической или центрической кольцевой аберрации, обычно называют избыточным ацентриком.

**беккерель (Бк)\*.** Единица СИ для *активности*, равной одному преобразованию в секунду.

- Заменяет внесистемную единицу *кюри (Ки)*. 1 Бк = 27 пКи ( $2,7 \times 10^{-11}$  Ки) приблизительно. 1 Ки =  $3,7 \times 10^{10}$  Бк.

**бета-излучение (beta radiation).** Корпускулярное излучение, состоящее из электронов и позитронов, возникающее при радиоактивном распаде определенных радионуклидов. Проникающая способность бета-частиц составляет от нескольких сантиметров до нескольких метров в воздухе и от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров в мягкой ткани или пластике.

**биологическая дозиметрия / биодозиметрия (biological dosimetry / biodosimetry).** Использование биомаркеров для подтверждения радиационного облучения и оценки поглощенной дозы.

**биологические эффекты (biological effects).** Диапазон возможных последствий в живом материале, организмах, тканях или клетках, зависящих от типа и степени повреждения клеток, к которым может привести облучение внешним агентом, таким как ионизирующее излучение.

**биомаркер (biomarker).** Индикатор нормальных или патогенных биологических процессов. Применительно к биологической дозиметрии биомаркеры используются для различения радиационно-индуцированных биологических повреждений и повреждений, вызванных другими агентами.

**быстрые нейтроны (fast neutrons).** Нейтроны, энергия которых превышает некоторый произвольный уровень, обычно приблизительно 1 МэВ.

**бромдезоксимуридин (БДУ) (5-Bromodeoxyuridine) (BrdU).** Аналог тимидина, в котором метильная группа в положении б' в тимине заменена бромом. БДУ используется в биологической дозиметрии для дифференциального мечения свежесинтезированной ДНК, с тем чтобы идентифицировать клетки, прошедшие митоз более чем один раз.

**гамма-излучение (gamma radiation).** Электромагнитное излучение (фотоны) высокой частоты (очень короткой длины волны), испускаемое ядром либо образующееся при распаде частиц или при явлениях аннигиляции. Гамма-лучи проникают через ткани организма глубже, чем бета- или альфа-частицы, но имеют более низкую линейную передачу энергии. Для защиты от гамма-излучения необходимо использовать тяжелые материалы, такие как свинец или бетон.

**гематопоз (haematopoiesis).** Образование компонентов клеток крови.

**генотоксин (genotoxin).** Любой химический или физический агент, вызывающий повреждение или мутацию генетического материала.



**грей (Гр) (gray, Gy)\*.** Единица СИ для кермы и поглощенной дозы, равная 1 Дж/кг. Он заменил рад. 1 Гр = 100 рад.

**двухнитевой разрыв (double strand break (DSB).** Тип повреждения ДНК; ДНК полностью разрывается вследствие разрыва фосфодиэфирной связи в обеих нитях двойной спирали в одном и том же локусе или в соседних локусах.

**двухъядерный (binucleated).** Имеющий два ядра. Двухъядерные клетки возникают в конце цикла деления ядра и могут накапливаться, используя ингибитор блокирования цитокинеза, такой как цитохалазин-В. Двухъядерные клетки подсчитывают на присутствие микроядер и нуклеоплазматических мостов в микроядерном тесте с блокированием цитокинеза (CBMN).

**дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) (deoxyribonucleic acid (DNA).** Молекула, содержащаяся в хромосомах, которая кодирует гены, ответственные за структуру и функцию организма, и позволяет передавать генетическую информацию от одного поколения к следующему.

**детерминированный эффект (deterministic effect)** Воздействие на здоровье излучения, для которого обычно существует пороговый уровень дозы, выше которого тяжесть проявления этого эффекта возрастает с увеличением дозы. Такой эффект характеризуется как серьезный детерминированный эффект, если он является смертельным или угрожающим жизни или приводит к постоянному ущербу, снижающему качество жизни.

**диплоид (diploid).** Видоспецифическое число хромосом в соматической клетке; у людей 46 (22 пары аутосом и две половых хромосомы).

**дисперсия (variance).** Статистическая мера удаления значений от центрального значения, вычисляемая как квадрат стандартного отклонения.

**дифференциальное С-окрашивание (C-banding).** См. «дифференциальное окрашивание хромосом».

**дифференциальное G-окрашивание (G-banding).** См. «дифференциальное окрашивание хромосом».

**дифференциальное окрашивание хромосом (chromosome banding).** Метод дифференциального окрашивания хромосом, обычно с использованием красителя Гимза. В зависимости от метода, визуализируется селективное окрашивание определенных хромосомных областей, таких как центромеры (С-бэндинг) или характерные рисунки вдоль плеч (G-бэндинг). Специфический рисунок темных и светлых полос, уникальный для каждой пары хромосом, используется для их идентификации и оценки их структуры.

**дицентрик (dicentric) (dic).** Аберрантная хромосома с двумя центромерами, появившаяся вследствие неправильной репарации двух нарушенных хромосом.

**доверительный интервал (confidence interval).** Интервальная оценка для рассматриваемой переменной (например, скорости), построенная согласно выбранному распределению (например, распределению Пуассона) так, чтобы этот диапазон имел заданную вероятность включения истинного значения переменной.

Таким образом, доверительный интервал (описываемый через верхнюю и нижнюю границу интервала) используется для выражения надежности оценки. Вероятность того, что интервал содержит указанный параметр, определяется доверительным уровнем [http://en.wikipedia.org/wiki/Confidence\\_level](http://en.wikipedia.org/wiki/Confidence_level) или коэффициентом доверительности. Увеличение необходимого доверительного уровня расширяет доверительный интервал.

**дозиметр, радиационный (dosimeter, radiation).** Физическое устройство, которое измеряет облучение ионизирующим излучением.

**смешанный пуассоновский метод (contaminated Poisson method).** Математический анализ частоты центрических колец и дицентрических хромосом, позволяющий оценивать дозу в случаях подозреваемого частичного облучения тела. Метод позволяет оценивать дозу путем рассмотрения распределения дицентриков среди всех подсчитанных клеток и дает дополнительную информацию относительно облученного объема тела. См. также «метод Qdr».

**контрольная группа (control group).** Группа клеток, животных или испытуемых людей, подвергающихся в максимальной мере воздействию тех же самых условий, что и облучаемые лица, за исключением воздействия исследуемого эффекта.

**ковариация (covariance).** Мера корреляции дисперсии между двумя (или более) зависимыми наборами данных, иными словами, показатель того, как эти данные совместно изменяются. Она может быть положительной или отрицательной, указывая на положительную или отрицательную линейную зависимость между наборами данных. Если данные являются независимыми, ковариация равна нулю.

**ковариация параметров кривой (covariance of curve parameters).** Параметры ( $C$ , альфа, бета) не имеют независимого отклонения от ее идеальных истинных значений (см. «стандартное отклонение», «дисперсия»), но отклоняются совместно до определенной величины корреляции, поскольку они вычисляются одновременно из одного и того же набора данных. Таким образом, уменьшается остаточный член в комбинированных вычислениях, таких как Ур. (7), по сравнению с тем, когда вычисление выполнено лишь с дисперсиями. Соответствующие корреляции можно также вычислить из дисперсий и ковариаций (ковариация, деленная на корень квадратный произведения двух дисперсий, то есть ковариация, деленная на произведение стандартных отклонений).

**подбор кривой (curve fitting).** Определение уравнения, описывающего оптимальный подбор относительно ряда точек данных, возможно, с несколькими другими ограничениями, включая взвешивание подбора по достоверности каждой точки данных (оцененной по стандартной ошибке в точке) и/или ограничение подбора измеренным базовым значением.

**облучение\* (exposure).** Действие или условия, в которых человек подвергается воздействию излучения.

Термин облучение не следует использовать в качестве синонима дозы. Доза – это мера воздействия облучения.

- Облучение может быть подразделено на категории согласно его характеру и продолжительности (см. ситуации облучения) или в соответствии с источником облучения, облучаемыми лицами и/или обстоятельствами, при которых они подвергаются воздействию (см. облучение, виды).

**внешнее облучение (external exposure).** Облучение от источника вне тела человека.

- Противоположно по значению внутреннему облучению.

**внутреннее облучение (internal exposure).** Облучение от источника внутри тела человека.

- Противоположно по значению внешнему облучению.

**лица, принимающие первые ответные меры (first responders)\*.** Работники аварийной службы, которые первыми осуществляют реагирование на месте развития аварийной ситуации.

**зиверт (Зв)\*, sievert (Sv).** Единица СИ для эквивалентной дозы и эффективной дозы, равная 1 Дж/кг.

**значимость, статистическая.** О статистической значимости говорят в том случае, если результат какого-либо данного эксперимента или исследования явно отклоняется от ожидаемого результата. Статистическая значимость результата данного эксперимента или исследования - предполагаемая мера степени его «истинности», то есть наличие причины, не являющейся простым шансом. В общем случае, отклонение наблюдаемого результата от ожидаемого считается значимым, если вероятность ошибки составляет меньше 5%.

**изотоп (isotope).** Атомы одних и тех же химических элементов, содержащие одинаковое число протонов и электронов, но разное число нейтронов (одинаковое атомное число, но другое массовое число). Изотопы являются одним и тем же химическим элементом, но имеют различные ядерные характеристики.

**инверсия (inversion).** Хромосомная перестройка, при которой сегмент хромосомы поворачивается на 180 градусов и повторно вставляется в хромосому в том же самом месте разрыва. Инверсия может быть пери- или парацентрической, в зависимости от того, включена или не включена центромера, соответственно.

**индекс деления ядер (nuclear division index) (NDI).** Мера средней скорости клеточного цикла, взятая по относительному числу клеток в популяции, которые достигли каждой последующей стадии деления, обычно к четвертому делению.

**инкорпорирование (incorporation).** Поступление радионуклида в организм через ингаляцию, прием пищи или через неповрежденную или поврежденную кожу.

**ионизация (ionization).** Физический процесс, посредством которого один или более орбитальных электронов выбиваются из атома или молекулы, приводя их в электрически заряженное состояние (ион). В результате этого процесса локально выделяется большое количество энергии, приблизительно 33 эВ на одно ионизирующее событие – более чем достаточно для разрыва сильной химической связи.

**инсерция (insertion).** Аномалия хромосомы, при которой ацентрический сегмент одной хромосомы вставляется в плечо другой хромосомы.

**искажать (confound).** Нарушать корреляцию между влияющей переменной (например, облучение ионизирующим излучением) и эффектом (например, индуцированные aberrации), изучаемыми в исследованиях, другой переменной (искажающий фактор, например, возраст, курение). Если искажающие факторы не учтены, то может быть предположена корреляция, не существующая в действительности, или реальная корреляция может быть размыта.

**взаимное сравнение (inter-comparison exercise).** Процедура, используемая для обеспечения и контроля качества. В биологической дозиметрии производится обмен материалами между лабораториями для сравнительного анализа.

**интерфаза (interphase).** Период клеточного цикла между митотическими делениями, в котором клетка находится большую часть времени и выполняет большую часть функций, таких как подготовка к делению клетки.

**калибровочная кривая (calibration curve).** В биологической дозиметрии, графическое или математическое описание зависимости доза-эффект, полученной при облучении проб крови известными дозами *in vitro*. Кривая используется для определения, путем интерполяции, поглощенной дозы радиации у потенциально облученного человека.

**кариотип (karyotype).** Систематическая расстановка гомологичных пар хромосом одной клетки, характеризующаяся размером, положением центромеры и рисунком дифференциального окрашивания согласно стандартной классификации.

**керма, воздух (кинетическая энергия, высвобожденная на единицу массы)\*.** Величина  $K$ , определяемая как:

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}$$

где:

$dE_{tr}$  - сумма начальных кинетических энергий всех заряженных ионизирующих частицы, высвобожденных незаряженными ионизирующими частицами в массе вещества  $dm$ .

- Единица: грей (Gy).
- Первоначально акроним для «кинетической энергии, высвобожденной в веществе», но теперь принятый как слово.

**кластоген (clastogen).** Физический или химический агент, разрушающий ДНК в хромосомах, приводя к перестройкам, таким как aberrации, наблюдаемые в метафазе.

**кластерные повреждения ДНК (clustered DNA lesions).** Более двух сайтов повреждений ДНК, произведенных ионизирующим излучением в пределах 20 пар оснований одной и той же молекулы.

**кольцо центрическое/ацентрическое (ring, centric/acentric).** Аберрантная кольцевая хромосома, содержащая / не содержащая центромеры, которая возникла в результате соединения двух разрывов в одной хромосоме.

**колхицин/колцемид (colchicine/colcemid).** Алкалоидные соединения, ингибирующие образование веретена при клеточном делении. Они используются для получения большого количества метафазных клеток, предотвращая их переход в анафазу. Колцемид является синтетическим аналогом природного колхицина, полученного из растений.

**лейкоцит (leukocyte).** Обобщенный термин, описывающий все виды белых кровяных клеток (например, лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, плазматические и моноциты).

**лейкоцитарная пленка (buffy coat).** Слой антикоагулированной пробы крови после центрифугирования, который содержит большинство лейкоцитов.

**лимфоцит (lymphocyte).** Один из видов лейкоцитов, встречающийся главным образом в крови, лимфе и лимфатических тканях, который формирует иммунокомпетентные клетки и их предшественники.

**линейная модель (linear model).** Общая математическая модель, используемая для описания биологического ответа на радиацию, в которой эффект  $Y$  является линейной функцией дозы  $D$ :

$$Y = \alpha D.$$

**линейная передача энергии (ЛПЭ)\* (linear energy transfer (LET),  $L_{\Delta}$ ).** Выражается формулой:

$$L_{\Delta} = \left( \frac{dE}{d\ell} \right)_{\Delta},$$

где

$dE$  - энергия, потерянная при пересечении расстояния  $d\ell$ , и  $\Delta$  - верхняя граница энергии, переданной при любом одиночном столкновении.

- Мера передачи энергии, как функции расстояния, от излучения к облучаемому веществу. Высокое значение линейной передачи энергии указывает на то, что энергия оседает в пределах малых расстояний.
  - $L_{\infty}$  (т.е. с  $\Delta = \infty$ ) называется «неограниченной линейной передачей энергии» при определении коэффициента качества.
  - $L_{\Delta}$  также известна как «ограниченная линейная тормозная способность вследствие столкновений».
- линейно-квадратичная модель (linear quadratic model).** Общая математическая модель, используемая для описания биологического ответа на излучение, где эффект  $Y$  является линейно-квадратичной функцией дозы  $D$ :

$$Y = \alpha D + \beta D^2.$$

**ложно-отрицательный результат (false negative).** Результат анализа, показывающий, что человек не облучен, когда он фактически облучен; то есть дается отрицательный результат анализа для облученного человека.

**ложно-положительный результат (false positive).** Результат анализа, показывающий, что человек облучен, когда он фактически не облучен; то есть дается положительный результат анализа для в действительности необлученного человека.

**мета-анализ (meta-analysis).** Исследования, где результаты аналогичных независимых исследований по определенной теме объединены, суммированы и оценены согласно определенным параметрам.

**метафаза (metaphase).** Стадия митоза в эукариотическом клеточном цикле, когда хромосомы сконденсированы до своей минимальной длины и располагаются в середине клетки, перед тем как произойдет разделение на две дочерних клеток.

**метод Qdr (Qdr method).** Математический анализ частоты центрических колец и дицентрических хромосом, позволяющий оценивать дозу в случаях подозреваемого частичного облучения тела. Метод позволяет оценивать дозу путем рассмотрения распределения дицентриков и колец среди лишь поврежденных клеток. См. также «смешанный пуассоновский метод».

**метод Qpcc (Qpcc method).** Математический анализ, идентичный Qdr (см. выше), в основу которого положено распределение фрагментов преждевременно конденсированных хромосом.

**микроядерный цитомный тест с блокированием цитокинеза (CBMN Cyt) (cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN Cyt)).** Тест CBMN Cyt является более продвинутым вариантом теста CBMN, в котором измеряется более широкий диапазон биомаркеров хромосомных повреждений (микроядра, нуклеоплазматические мосты, ядерные почки в двухъядерных клетках), а также гибель клеток (некротические и апоптозные клетки) и цитостаз (индекс деления ядер, основанный на отношениях одноядерных, двухъядерных и многоядерных клеток). Биомаркеры микроядер и нуклеоплазматических мостов являются в этой системе биомаркерами, лучше всего утвердившимися в биологической дозиметрии облучения ионизирующим излучением.

**микроядро (micronucleus).** Микроядро представляет собой дополнительное малое ядро, встречающееся в клетках с повреждением хромосом. Как правило, микроядро возникает при отставании целой хромосомы или ацентрического фрагмента хромосомы в анафазе. Диаметр микроядра обычно составляет от 1/16 до 1/3 от размера основного ядра одноядерной или двухъядерной клетки. Микроядра и ядра имеют одинаковую структуру и красящие свойства.

**митоген (mitogen).** Реагент, стимулирующий пролиферацию клеток.

**митоз (mitosis).** Часть процесса клеточного деления, при котором происходит деление хромосом эукариотической клетки на два идентичных набора.

**митотический индекс (mitotic index).** Процент клеток в состоянии митоза в любой момент времени.

**мощность дозы (dose rate)** Мера мощности, при которой энергия излучения передается мишени. Хотя мощность дозы может быть в принципе определена для любого отрезка времени (например, годовая доза технически - это мощность дозы), обычно термин мощность дозы используется только в контексте коротких промежутков времени, например, дозы в секунду или дозы в час.

**мутаген (mutagen).** Любой химический или физический агент, обладающий способностью индуцировать генетическую мутацию в последовательности оснований молекулы ДНК или на хромосомном уровне организации.

**мутация (mutation).** Любое изменение гена относительно его естественного состояния; может вызывать болезни или быть доброкачественной, в нормальном варианте.

**нейтроны деления (fission neutrons).** Свободные нейтроны, обычно производимые во время деления ядер – ядерной реакции, при которой тяжелое ядро атома расщепляется на две приблизительно равные части (ядра более легких элементов), сопровождающейся выделением относительно большого количества энергии.

**нейтронное излучение (neutron radiation).** Нейтроны, один из компонентов атомного ядра, являются электрически нейтральными элементарными частицами. В частности, они высвобождаются во время деления ядер, и имеют высокую проникающую способность.

**нестабильная аберрация (unstable aberration).** Хромосомная перестройка в клетке, которая может быть летальной по отношению к этой клетке или ее дочерним клеткам, поскольку она приводит к потере генетического материала или несбалансированной передаче генетического материала во время митоза.

**нестабильная клетка (unstable cell).** Клетка с нестабильной аберрацией, такой как дицентрик, кольцо или ацентрический фрагмент.

**нуклеоплазматический мост (nucleoplasmic bridge) (NPB).** Имеет место, когда центромеры дицентрических хромосом или хроматид вытягиваются к противоположным полюсам клетки в анафазе. При проведении СВМ-теста могут наблюдаться двухъядерные клетки с нуклеоплазматическим мостом, поскольку цитокинез ингибирован, что предотвращает разрыв анафазных мостов, из которых получаются нуклеоплазматические мосты.

**нуклеосома (nucleosome).** Эти структуры образуют элементарные повторяющиеся единицы в упаковке эукариотического хроматина в хромосоме.

**нуклид (nuclide).** Тип атома, характеризуемый числом протонов (зарядом ядра) и атомным номером.

**однонитевой разрыв (SSB) (single strand break)** Тип повреждений ДНК, при котором ДНК разрывается лишь по одной нити двойной спирали.

**ОСЛ-дозиметр (оптически стимулируемый люминесцентный) (OSL dosimeter (optically stimulated luminescence)).** Тип физического дозиметра, используемый для измерения облучения ионизирующим излучением.

**относительная биологическая эффективность (ОБЭ)\* (relative biological effectiveness (RBE))** Относительная мера эффективности различных видов излучения при индуцировании указанного воздействия на здоровье, выражаемая как отношение обратных величин поглощенных доз двух различных видов излучения, которые будут давать одинаковую степень определенной биологической конечной точки.

**отношение шансов (odds ratio).** Отношение двух шансов, вычисленных, чтобы показать вероятность нулевой дозы относительно подозреваемой (например, пленочный дозиметр) или физически измеренной дозой.

**PAINT** (Сокращение от «Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology» - **Протокол для идентификации аберраций и номенклатурной терминологии**). Термин используется в анализе по методу FISH для описания хромосомных аберраций.

**панцентромерный зонд (pan-centromeric probe).** ДНК-зонды, маркирующие центромерную область каждой хромосомы.

**период полувыведения\* (half-time).** Время, необходимое для того, чтобы значение параметра снизилось на 50% от его первоначального значения. В биологической дозиметрии этот термин используется для описания рециркуляции лимфоцитов периферической крови.

**период полураспада\* (half-life) ( $T_{1/2}$ )**

1) Применительно к радионуклиду – это время, требующееся для того, чтобы активность снизилась наполовину в результате радиоактивного распада.

- Когда необходимо провести различие между этим значением и другими значениями, обозначающими период полувыведения (см. (2)), следует использовать термин «период радиоактивного полураспада».
- Период полураспада связан с постоянной распада  $\lambda$  следующим выражением:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}.$$

2) Время, необходимое для того, чтобы количество данного вещества (например, радионуклида) в данном месте уменьшилось наполовину в результате любого конкретного процесса или процессов, которые развиваются по экспоненте аналогично радиоактивному распаду.

**биологический период полувыведения (biological half-life).** Время, необходимое для того, чтобы количество вещества в данной ткани, данном органе или участке тела (или в любой другой конкретной биоте) уменьшилось вдвое в результате биологических процессов.

**эффективный период полураспада ( $T_{\text{eff}}$ ) (effective half-life,  $T_{\text{eff}}$ ).** Время, необходимое для того, чтобы активность радионуклида в данном месте уменьшилась вдвое в результате всех связанных с этим процессов.

$$\frac{1}{T_{\text{eff}}} = \sum_i \frac{1}{T_i},$$

где  $T_i$  - период полураспада для процесса  $i$ .



**период радиоактивного полураспада (radioactive half-life).** Применительно к радионуклиду – это время, требующееся для того, чтобы активность снизилась наполовину в результате радиоактивного распада.

- Для выражения этого понятия также применяется термин **физический период полураспада**.

**плотноионизирующее излучение / излучение с высокой ЛПЭ (densely-ionizing/high-LET radiation).** Излучение, выделяющее энергию в близко расположенных взаимодействиях вдоль своего трека (например, альфа-частицы, нейтроны). Это пространственное распределение отражено в относительной биологической эффективности. См. также «линейная передача энергии, ЛПЭ».

**поглощенная доза (absorbed dose) (D)\*.** Фундаментальная дозиметрическая величина  $D$ , выражаемая формулой:

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm},$$

где  $d\bar{\varepsilon}$  - средняя энергия, переданная ионизирующим излучением веществу, находящемуся в элементарном объеме, а  $dm$  - масса вещества в этом элементарном объеме.

- Энергия может быть усреднена по любому определенному объему, и в этом случае средняя доза будет равна переданному объему полной энергии, деленной на массу этого объема.
- Поглощенная доза определяется в определенной точке.
- Единица: грей (Гр), равный 1 Дж/кг (ранее использовался *рад*).

**полимеразная цепная реакция (ПЦР) (polymerase chain reaction (PCR)).** Процедура ферментативной амплификации последовательности ДНК через повторяемую репликацию при помощи ДНК-полимеразы.

**предел обнаружения (detection limit).** Доза, представленная самой низкой частотой данного биодозиметрического маркера, которую можно различить сверх фоновой частоты с определенным доверительным интервалом, обычно 95%.

**равновесие заряженных частиц (charged particle equilibrium).** Происходит в случае, когда число каждого вида заряженных частиц, выходящих из данного объема, равно числу заряженных частиц, поступающих в объем.

**радиоактивное загрязнение\* (contamination).** Радиоактивные вещества, находящиеся на поверхности или в твердом теле, жидкости или газах (в том числе в теле человека), где их присутствие является непредумышленным или нежелательным, или процесс, приводящий к возникновению их присутствия в таких местах.

**редкоионизирующее излучение / излучение с низкой ЛПЭ (sparsely-ionizing / low-LET ionizing radiation).** См. «плотноионизирующее излучение / излучение с высокой ЛПЭ» и «линейная передача энергии, ЛПЭ».

**рентген (P) (röntgen (R) \*).** Единица облучения, равная  $2,58 \times 10^{-4}$  Кл/кг (точно).

- Заменен единицей СИ Кл/кг.

**рентгеновское излучение (X-radiation).** Коротковолновое электромагнитное излучение (фотоны), испускаемые либо электронами электронных оболочек за пределами ядра, либо при ускорении для получения тормозного излучения. Оно имеет более короткую длину волны, чем ультрафиолетовое излучение, и более длинную, чем гамма-излучение. Для экранирования рентгеновского излучения необходимо использовать тяжелые материалы, такие как свинец.

**сдвиг (bias).** Отклонение результатов или выводов от истинного значения, или процессы, приводящие к такому отклонению.

**сервисная лаборатория (service laboratory).** В контексте данной публикации этот термин относится к лаборатории, специализированной на выполнении биологических дозиметрических измерений.

**сложная перестройка (complex rearrangement).** Аберрация, вовлекающая три или больше разрывов в двух или более хромосомах и характерно индуцируемая после облучения плотноионизирующим излучением или высокими дозами редкоионизирующего излучения.

**сортировка (triage).** Процесс приоритезации пациентов, основанный на серьезности их состояния. Цитогенетическая сортировка представляет собой использование результатов биологической дозиметрии с целью обоснования медицинских решений.

**стабильная клетка (stable cell).** Клетка без нестабильных аберраций. Это может быть полностью неповрежденная клетка или клетка, содержащая лишь аберрации стабильного типа.

**стандартное отклонение (standard deviation (SD)).** Количественный показатель меры изменения в выборке измерений из популяции, показывающий, насколько широк разброс значений в выборке данных. Для данных, приближающихся нормальному распределению, стандартное отклонение параметра кривой указывает, как далеко оно может отклониться от истинного значения, которое может идеально считаться среднеквадратичным значением по большой популяции доноров калибровки (или экспериментов), основанным на больших количествах клеток для каждого из них. См. также «ковариация».

**стандартная ошибка среднего значения (standard error of the mean (SEM)).** Количественный показатель меры изменения в выборке измерений от приблизительно нормальной популяции, показывающий, насколько далеко среднее значение по выборке может отклониться от истинного среднего значения по популяции, таким образом количественно определяя, насколько точно известно истинное среднее значение по популяции.

**синхронизация (synchronization).** Применительно к культивированию клетки, это процесс манипуляции клетками для приведения их к одному и тому же этапу клеточного цикла.

## **ситуации облучения\* (exposure situations).**

**острое облучение (acute exposure).** Облучение, полученное в течение короткого периода времени. Обычно этот термин употребляется для обозначения облучения достаточно короткой продолжительности, при котором возникающие в результате дозы могут рассматриваться как мгновенные (например, менее одного часа).

**хроническое облучение (chronic exposure).** Облучение, продолжающееся на протяжении длительного времени. Прилагательное «хроническое» характеризует только продолжительность облучения и ни коим образом не отражает величину доз. Обычно употребляется для обозначения облучения, продолжающегося в течение многих лет, от долгоживущих радионуклидов в окружающей среде. Международная комиссия по радиологической защите использует термин «длительное облучение» (prolonged exposure) для выражения этого же понятия «хроническое облучение». Оба термина противопоставляются термину «острое облучение».

**стабильная аберрация (stable aberration).** Нелетальная хромосомная перестройка или обмен между хромосомами или внутри хромосом без потери генетического материала во время митоза.

**стохастический эффект (радиации) (stochastic effect (of radiation)).** Радиационно-индуцированное воздействие на здоровье, вероятность возникновения которого больше для более высокой дозы радиации и серьезность которого (если это происходит) не зависит от дозы. Стохастические эффекты могут быть соматическими или наследственными, и в общем случае происходят без порогового уровня дозы. Примеры включают рак щитовидной железы и лейкемию.

**теломера (telomere).** Концевой участок каждого плеча хромосомы, состоящий из тандемных повторов последовательностей TTAGGG, которые защищают от слияний хромосом и образования дицентрических хромосом. Теломерные последовательности могут теряться при каждом цикле репликации ДНК или при микроределециях в последовательности.

**теория полости Брэгга-Грея (Bragg-Gray cavity theory).** Устанавливает зависимость ионизации, произведенной в газонаполненной полости внутри среды, от энергии, поглощенной в этой окружающей среде. В контексте образования хромосомной аберрации применение этой теории означает, что размер ядра клетки является настолько малым, что вся поглощенная энергия обусловлена лишь электронами, проходящими через ядро. Следовательно, вторичные частицы могут быть проигнорированы.

**ТЛД-дозиметр (термолюминесцентный) (TLD dosimeter (thermoluminescent)).** Тип физического дозиметра используемый для измерения облучения ионизирующим излучением.

**транслокация (translocation).** Хромосомная перестройка, при которой целая хромосома или сегмент хромосомы прикрепляются к другой целой хромосоме или сегменту или обмениваются с ними, полученный гибрид вместе сегрегируется в мейозе.

**реципрокная транслокация (двунаправленная или полная транслокация).** Обмен терминальными частями двух отдельных хромосом.

**нереципрокная транслокация (однонаправленная или неполная транслокация).**

Транслокация одного сегмента хромосомы; отсутствие взаимного обмена.

**тритиевая вода (tritiated water).** Форма воды, в которой обычные атомы водорода замещены тритием, радиоактивным изотопом водорода.

**трицентрик (tricentric).** Аберрантная хромосома с тремя центромерами, получающаяся в результате соединения частей трех разорванных хромосом. Для целей вычисления их рассматривают как эквивалентные двум дицентрикам и они сопровождаются двумя ацентрическими фрагментами.

**фантом (phantom).** Устройство, которое поглощает и рассеивает гамма- и рентгеновское излучение приблизительно таким же образом, как ткани тела (например, для дозиметрических измерений или облучения проб крови, необходимого для получения калибровочной кривой доза-эффект).

**фермент (enzyme).** Молекула белка, катализирующего химические реакции других веществ без собственного разрушения или изменения по завершении реакций.

**флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization (FISH)).** Метод, используемый для определения присутствия специфических хромосом или хромосомных областей путем нанесения флуоресцентно маркированных ДНК-зондов на денатурированную хромосомную ДНК.

**интерфазный FISH.** Зонды вводятся непосредственно в интерфазную клетку. Это позволяет визуализировать изменения на уровне хромосомных доменов.

**метафазный FISH.** Зонды вводятся в хромосомы в метафазе. Это позволяет визуализировать хромосомные аберрации.

**методы FISH:**

**многокрасочный FISH (mFISH).** В mFISH используются цельнохромосомные окрашивающие ДНК-зонды, маркированные уникальной комбинацией флуоресцентных красителей для каждой хромосомы человека.

**pq-mFISH.** Разновидность mFISH, при которой различаются отдельные плечи хромосомы.

**флуорохром (fluorochrome).** Молекулы, которые становятся флуоресцентными при соответствующем возбуждении. Они используются для цитогенетики по методу FISH для выделения специфических хромосомных областей.

**фоновая частота/уровень/значение.** Распространенность (или число) хромосомных аберраций или микроядер, зарегистрированная у населения.

**«хромосома арлекина» (harlequin chromosome).** Хромосома, которая была дифференциально маркирована и окрашена после захвата BrdU во время двух циклов репликации. После соответствующего окрашивания одна из сестринских хроматид кажется темной, а другая кажется светлой.

**центромера (centromere).** Область первичной перетяжки хромосомы, которая визуализируется во время митоза и соединяет пару хроматид.

**цепь обеспечения сохранности (chain-of-custody).** Полная регистрация пробы крови путем отслеживания ее перемещения, обработки и хранения от пункта забора/получения крови до конечной утилизации пробы.

**цитогенетика (cytogenetics).** Раздел генетики, относящийся к исследованию хромосом

**цитохалазин-B (cytochalasin B).** Природное соединение грибкового происхождения с уникальной способностью ингибирования цитокинеза в клетках млекопитающих и человека, используемое в микроядерном тесте с блокированием цитокинеза.

**электронно-спиновый резонанс (ЭСР) / электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) (electron spin resonance (ESR) / electron paramagnetic resonance (EPR)).** Метод изучения химических соединений, имеющих один или более непарных электронов, таких как органические и неорганические свободные радикалы или неорганические комплексы, имеющие ион переходного металла. Явление может использоваться для радиационной дозиметрии.

**эпидемиология (epidemiology).** Исследование распределения и детерминант состояний или событий, связанных со здоровьем, в определенных популяциях, и применение результатов этого исследования для решения проблем здоровья.

**ядерная почка (nuclear bud).** Тела, подобные микроядру, прикрепленные к ядру тонкой нуклеоплазматической связью; ядерная аномалия.

**G-функция (G-function).** Фактор с временной зависимостью, используемый для изменения коэффициента квадрата дозы линейно-квадратичной зависимости доза-эффект, позволяющий учитывать растягивание дозы во времени.

***in vitro.*** Наблюдаемый или выполненный в пробирке.

***in vivo.*** Наблюдаемый или выполненный в живом организме.



## СОСТАВИТЕЛИ И РЕЦЕНЗЕНТЫ

|                  |   |
|------------------|---|
| Ainsbury, E.     | Агентство по здравоохранению, Соединенное Королевство                               |
| Barquinero, J.F. | Автономный университет Барселоны, Испания   |
| Beinke, C.       | Институт радиобиологии бундесвера, Германия   |
| Blakely, W.F.    | Институт радиобиологических исследований вооруженных сил, Соединенные Штаты Америки |
| Braselmann, H.   | Центр им. Гельмгольца, Германия   |
| Буглова, Е.      | Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ)                                 |
| Carr, Z.         | Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ)   |
| Di Giorgio, M.   | Агентство по ядерному регулированию, Аргентина                                      |
| Fenech, M.       | Научно-промышленная исследовательская организация Содружества (НПИОС), Австралия    |
| Garcia Lima, O.  | Центр гигиены и радиационной защиты, Куба   |
| Kodama, Y.       | Фонд изучения радиационных последствий, Япония                                      |
| Lindholm, C.     | Управление по радиационной и ядерной безопасности (СТУК), Финляндия                 |
| Livingston, G.   | Ассоциация университетов Окриджа (АУО), Соединенные Штаты Америки                   |
| Lloyd, D.C.      | консультант, Соединенное Королевство  |
| Мазнык, Н.А.     | Институт медицинской радиологии АМН Украины   |
| Prasanna, P.G.S. | Национальные институты здравоохранения, Соединенные Штаты Америки                   |
| Previsani, N.    | Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ)   |
| Romm, H.         | Федеральная служба радиационной защиты (ФСРЗ), Германия                             |
| Roy, L.          | Институт радиационной защиты и ядерной безопасности (ИРЗЯБ), Франция                |
| Voisin, P.J.     | Институт радиационной защиты и ядерной безопасности (ИРЗЯБ), Франция                |
| Vral, A.         | Гентский университет, Бельгия   |
| Wilkins, R.C.    | «Хэлс Канада», Канада   |
| Yoshida, M.      | Университет Хиросаки, Япония  |





## ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ ЗА ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Азизова, Т.             | Южно-Уральский институт биофизики, Российская Федерация  |
| Barrios, L.             | Автономный университет Барселоны, Испания  |
| Bognár, G.              | Национальный научно-исследовательский институт радиобиологии и радиационной гигиены, Венгрия                         |
| Darroudi, F.            | Медицинский центр Лейденского университета, Нидерланды   |
| Devantier, Y.           | Чок-Риверские лаборатории, Канада  |
| Espinoza Zevallos, M.   | Перуанский институт ядерной энергии, Перу  |
| Guerrero Carbajal, Y.C. | Национальный институт ядерных исследований, Мексика  |
| Güçlü, I.               | Ядерный научно-исследовательский и учебный центр "Чекмече" (ЯНУЦЧ), Турция   |
| Hayata, I.              | консультант, Япония  |
| Martínez-López, W.      | Институт биологических исследований им. Клементе Эстабле, Уругвай  |
| Natarajan, A.T.         | Университет Тусции, Италия   |
| Oliveira, M.            | Институт радиационной защиты и дозиметрии, Бразилия  |
| Palitti, F.             | Университет Тусции, Италия   |
| Pantelias, G.           | Институт радиоизотопов и радиодиагностических препаратов, Национальный центр научных исследований «Демокрит», Греция |
| Sasaki, M.S.            | Киотский университет, Япония   |
| Сотник, Н.              | Южно-Уральский институт биофизики, Российская Федерация  |
| Turai, I.               | Национальный научно-исследовательский институт радиобиологии и радиационной гигиены, Венгрия                         |
| Valdivia Pottstock, P.  | Чилийская комиссия по ядерной энергии, Чили  |
| Возилова, А.            | Уральский научно-практический центр радиационной медицины (УНПЦРМ), Российская Федерация                             |
| Wilkinson, D.           | Агентство оборонных исследований и разработок Канады, Канада   |





# IAEA

Международное агентство по атомной энергии

№ 23

## ЗАКАЗ В СТРАНАХ

В указанных странах платные публикации МАГАТЭ могут быть приобретены у перечисленных ниже поставщиков или в крупных книжных магазинах.

Заказы бесплатных публикаций следует направлять непосредственно в МАГАТЭ. Контактная информация приводится в конце настоящего перечня.

### АВСТРАЛИЯ

#### **DA Information Services**

648 Whitehorse Road, Mitcham, VIC 3132, AUSTRALIA

Телефон: +61 3 9210 7777 • Факс: +61 3 9210 7788

Эл. почта: [books@dadirect.com.au](mailto:books@dadirect.com.au) • Веб-сайт: <http://www.dadirect.com.au>

### БЕЛЬГИЯ

#### **Jean de Lannoy**

Avenue du Roi 202, 1190 Brussels, BELGIUM

Телефон: +32 2 5384 308 • Факс: +32 2 5380 841

Эл. почта: [jean.de.lannoy@euronet.be](mailto:jean.de.lannoy@euronet.be) • Веб-сайт: <http://www.jean-de-lannoy.be>

### КАНАДА

#### **Renouf Publishing Co. Ltd.**

Телефон: +1 613 745 2665 • Факс: +1 643 745 7660

5369 Canotek Road, Ottawa, ON K1J 9J3, CANADA

Эл. почта: [order@renoufbooks.com](mailto:order@renoufbooks.com) • Веб-сайт: <http://www.renoufbooks.com>

#### **Bernan Associates**

4501 Forbes Blvd, Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, USA

Телефон +1 800 8653457 • Факс: 1 800 865 3450

Эл. почта: [orders@bernan.com](mailto:orders@bernan.com) • Веб-сайт: <http://www.bernan.com>

### ЧЕШСКАЯ РЕСПУБЛИКА

#### **Suweco CZ, spol. S.r.o.**

Klesakova 347, 180 21 Prague 9, CZECH REPUBLIC

Телефон +420 242 459 202 • Факс: +420 242 459 203

Эл. почта: [nakup@suweco.cz](mailto:nakup@suweco.cz) • Веб-сайт: <http://www.suweco.cz>

### ФИНЛЯНДИЯ

#### **Akateeminen Kirjakauppa**

PO Box 128 (Keskuskatu 1), 00101 Helsinki, FINLAND

Телефон: +358 9 121 41 • Факс: +358 9 121 4450

Эл. почта: [akatilau@akateeminen.com](mailto:akatilau@akateeminen.com) • Веб-сайт: <http://www.akateeminen.com>

### ФРАНЦИЯ

#### **Form-Edit**

5, rue Janssen, PO Box 25, 75921 Paris CEDEX, FRANCE

Телефон: +33 1 42 01 49 49 • Факс: +33 1 42 01 90 90

Эл. почта: [fabien.boucard@formedit.fr](mailto:fabien.boucard@formedit.fr) • Веб-сайт: <http://www.formedit.fr>

#### **Lavoisier SAS**

14, rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCE

Телефон: +33 1 47 40 67 00 • Факс: +33 1 47 40 67 02

Эл. почта: [livres@lavoisier.fr](mailto:livres@lavoisier.fr) • Веб-сайт: <http://www.lavoisier.fr>

#### **L'Appel du livre**

99, rue de Charonne, 75011 Paris, FRANCE

Телефон: +33 1 43 07 50 80 • Факс: +33 1 43 07 50 80

Эл. почта: [livres@appeldulivre.fr](mailto:livres@appeldulivre.fr) • Веб-сайт: <http://www.appeldulivre.fr>

### ГЕРМАНИЯ

#### **Goethe Buchhandlung Teubig GmbH**

Schweitzer Fachinformationen

Willstaetterstrasse 15, 40549 Duesseldorf, GERMANY

Телефон: +49 (0) 211 49 8740 • Факс: +49 (0) 211 49

Эл. почта: [s.dehaan@schweitzer-online.de](mailto:s.dehaan@schweitzer-online.de) • Веб-сайт: <http://www.goethebuch.de/>

### ВЕНГРИЯ

#### **Librotade Ltd., Book Import**

PF 126, 1656 Budapest, HUNGARY

Телефон: +36 1 257 7777 • Факс: +36 1 257 7472

Эл. почта: [books@librotade.hu](mailto:books@librotade.hu) • Веб-сайт: <http://www.librotade.hu>

## ИНДИЯ

### **Allied Publishers Pvt. Ltd.**

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg  
Ballard Estate, Mumbai 400001, INDIA  
Телефон: +91 22 42126969/31 • Факс: +91 22 2261 7928  
Эл. почта: arjunsachdev@alliedpublishers.com • Веб-сайт: <http://www.alliedpublishers.com>

### **Bookwell**

3/79 Nirankari, Dehli 110009, INDIA  
Телефон: +91 11 2760 1283 • Факс: +91 11 27604536  
Эл. почта: bkwell@nde.vsnl.net.in • Веб-сайт: <http://www.bookwellindia.com/>

## ИТАЛИЯ

### **Libreria Scientifica "AEIOU"**

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milan, ITALY  
Телефон: +39 02 48 95 45 52 • Факс: +39 02 48 95 45 48  
Эл. почта: info@libreriaaeiou.eu • Веб-сайт: <http://www.libreriaaeiou.eu/>

## ЯПОНИЯ

### **Maruzen Co., Ltd.**

1-9-18 Kaigan, Minato-ku, Tokyo 105-0022, JAPAN  
Телефон: +81 3 6367 6047 • Факс: +81 3 6367 6160  
Эл. почта: journal@maruzen.co.jp • Веб-сайт: <http://www.maruzen.co.jp>

## НИДЕРЛАНДЫ

### **Martinus Nijhoff International**

Koraalrood 50, Postbus 1853, 2700 CZ Zoetermeer, NETHERLANDS  
Телефон: +31 793 684 400 • Факс: +31 793 615 698  
Эл. почта: info@nijhoff.nl • Веб-сайт: <http://www.nijhoff.nl>

### **Swets**

PO Box 26, 2300 AA Leiden  
Dellaertweg 9b, 2316 WZ Leiden, NETHERLANDS  
Телефон: +31 88 4679 263 • Факс: +31 88 4679 388  
Эл. почта: tbeysens@nl.swets.com • Веб-сайт: [www.swets.com](http://www.swets.com)

## СЛОВЕНИЯ

### **Cankarjeva Založba dd**

Kopitarjeva 2, 1515 Ljubljana, SLOVENIA  
Телефон: +386 1 432 31 44 • Факс: +386 1 230 14 35  
Эл. почта: import.books@cankarjeva-z.si • Веб-сайт: [http://www.mladinska.com/cankarjeva\\_zalozba](http://www.mladinska.com/cankarjeva_zalozba)

## ИСПАНИЯ

### **Diaz de Santos, S.A.**

Librerias Bookshop • Departamento de pedidos  
Calle Albasanz 2, esquina Hermanos Garcia Noblejas 21, 28037 Madrid, SPAIN  
Телефон: +34 917 43 48 90  
Эл. почта: compras@diazdesantos.es • Веб-сайт: <http://www.diazdesantos.es/>

## СОЕДИНЕННОЕ КОРОЛЕВСТВО

### **The Stationery Office Ltd. (TSO)**

PO Box 29, Norwich, Norfolk, NR3 1PD, UNITED KINGDOM  
Телефон: +44 870 600 5552  
Эл. почта (заказы): books.orders@tso.co.uk • (справки): book.enquiries@tso.co.uk • Веб-сайт: <http://www.tso.co.uk>

Онлайновые заказы:

### **DELTA International Ltd.**

39, Alexandra Road, Addlestone, Surrey, KT15 2PQ, UNITED KINGDOM  
Эл. почта: info@profbooks.com • Веб-сайт: <http://www.profbooks.com>

## Организация Объединенных Наций (ООН)

300 East 42nd Street, IN-919J, New York, NY 1001, USA  
Телефон +1 212 963 8302 • Факс: +1 212 963 3489  
Эл. почта: publications@un.org • Веб-сайт: <http://www.unp.un.org>

## СОЕДИНЕННЫЕ ШТАТЫ АМЕРИКИ

### **Bernan Associates**

4501 Forbes Blvd, Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, USA  
Телефон +1 800 865 3457 • Факс: 1 800 865 3450  
Эл. почта: orders@bernan.com • Веб-сайт: <http://www.bernan.com>

### **Renouf Publishing Co. Ltd.**

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669, USA  
Телефон: +800 551 7470 (бесплатный) • Факс: +800 568 8546 (бесплатный)  
Эл. почта: orders@renoufbooks.com • Веб-сайт: <http://www.renoufbooks.com>

## Заказы платных и бесплатных публикаций можно направлять непосредственно по адресу:

IAEA Publishing Section, Marketing and Sales Unit, International Atomic Energy Agency  
Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria  
Телефон: +43 1 2600 22529 или 22488 • Факс: +43 1 2600 29302  
Эл. почта: sales.publications@iaea.org • Веб-сайт: <http://www.iaea.org/books>





