

*На правах рукописи*

**КОРЯКИНА Екатерина Владимировна**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ  
НАРУШЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНОГО И НЕПРЕРЫВНОГО ИЗЛУЧЕНИЙ  
РЕАКТОРА БАРС-6**

03.00.01 – радиобиология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Обнинск – 2008

Работа выполнена в лаборатории радиационной цитогенетики и в отделе радиационной биофизики Государственного учреждения – Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор Севаньяев Александр Васильевич.

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук Нугис Владимир Юрьевич;

доктор биологических наук Спирин Евгений Викторович.

**Ведущая организация:**

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна.

Защита диссертации состоится « 26 » февраля 2008 г. в 11 ч. на заседании диссертационного совета Д 001.011.01 при ГУ – Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук по адресу: 249036, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королева, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ – МРНЦ РАМН.

Автореферат разослан « 10 » января 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Палыга Г.Ф.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Фактор времени облучения – мощность дозы (МД) – имеет большое значение при регистрации радиобиологических и, в частности, цитогенетических эффектов. Однако в современной радиобиологии относительно мало исследованы эффекты импульсного облучения, особенно на цитогенетическом уровне. Практически не изучены особенности биологического действия импульсного нейтронного излучения, хотя в отдельных работах и делалась попытка оценить цитогенетический эффект на культуре лимфоцитов крови человека при использовании импульсных источников электронов (Piggot R.J., 1977), а в других – при различных режимах импульсного облучения нейтронами (Севанькаев А.В., 1989; Поздышкина О.В., 2000).

В последние годы в МРНЦ РАМН начаты биологические исследования с использованием уникального импульсного реактора БАРС-6 ФГУП Государственный научный центр РФ – Физико-Энергетический Институт (ГНЦ РФ – ФЭИ), позволяющего получать отдельные импульсы нейтронного излучения (с сопутствующим  $\gamma$ -излучением) длительностью около 70 мкс, с максимальной МД нейтронов порядка  $10^9$  Гр/мин при вкладе  $\gamma$ -излучения в дозу 15% и выше (Прохоров Ю.А., 1998). Важной технической особенностью этого реактора является его способность генерировать нейтронное излучение в непрерывном режиме работы при сохранении всех физико-дозиметрических характеристик импульсного излучения, что позволяет проводить сравнение биологических эффектов в зависимости от вида излучения. Следует подчеркнуть, что несмотря на импульсный характер нейтронного излучения, генерируемого на циклотронах, отсутствие непрерывного режима облучения на этих источниках не позволяет адекватно исследовать эффекты импульсного воздействия. Кроме того, реактор БАРС-6 предоставляет также возможность исследовать закономерности и механизмы действия смешанного  $\gamma$ -нейтронного излучения, что является актуальной задачей современной радиобиологии и радиотерапии (Пахомова О.Н., 1995; Цыб Т.С., 1997; Обатуров Г.М., 1997, 1998; Suzuki S., 1993).

Важность проблемы импульсного нейтронного воздействия обусловлена не только фундаментальными аспектами, но и некоторыми актуальными практическими задачами. В частности, на основе теоретических предпосылок обосновывается целесообразность применения излучения с высокой МД, в том числе импульсных источников, для повышения эффективности лучевой терапии онкологических больных.

**Цель и основные задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение закономерностей образования структурных повреждений хромосом в культуре лимфоцитов крови человека при действии излучения реактора БАРС-6 в режиме одиночных импульсов при сверхвысоких МД и непрерывного облучения. При этом оценивались особенности реакции клеток на облучение в стадии «покоя»  $G_0$ . Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать методологию облучения образцов крови человека для сравнения цитогенетических эффектов в наиболее адекватных условиях воздействия непрерывного нейтронного излучения и импульсного со сверхвысокой МД.

2. Изучить закономерности индукции аберраций хромосом при воздействии различных доз в обоих режимах облучения и возможность модификации цитогенетического эффекта.

3. Определить относительную биологическую эффективность нейтронного излучения реактора БАРС-6 в зависимости от вида радиационного воздействия – импульсного или непрерывного.

**Научная новизна.** Впервые установлена различная цитогенетическая эффективность реакторного нейтронного излучения (с сопутствующим  $\gamma$ -излучением) при воздействии на лимфоциты крови человека в режиме одиночных импульсов со сверхвысокой МД и в режиме непрерывного облучения, обеспечивающем сравнение в максимально возможных адекватных условиях, а также исследованы закономерности проявления обратного эффекта мощности дозы.

Показано, что величина наблюдаемого эффекта во впервые исследованном диапазоне сверхвысоких МД  $(0,5-2,7) \cdot 10^6$  Гр/мин при дозах 0,5–2,5 Гр зависит от используемого цитогенетического показателя, которая оказалась максимальной для частоты межхромосомных обменов (дицентриков) и суммарной частоты аберраций хромосом (АХ) и минимальной для частоты интерстициальных делеций и числа поврежденных клеток.

Величина цитогенетического эффекта при облучении клеток при комнатной температуре (20°C) оказалась такой же, как и при их облучении при температуре 0°C, ингибирующей ферментативные процессы в клетке. Это может указывать, что различия в цитогенетических эффектах импульсного и непрерывного облучения формируются на начальных (физико-химической и химической) стадиях радиационного воздействия, и/или они не связаны с ферментативными процессами, которые ингибируются низкой температурой.

Получены новые экспериментальные данные о закономерностях формирования отдельных типов АХ и их распределения по клеткам. Впервые показано, что при импульсном облучении, по сравнению с непрерывным, спектр обменных АХ смещается в сторону внутривлецевых типов АХ, свидетельствуя о проявлении эффекта «близости», связанного, возможно, как со смешанным составом излучения (нейтроны и  $\gamma$ -лучи), так и с конформационными изменениями хроматина в момент облучения.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Используемая в работе методология проведения парных экспериментов, заключающаяся в облучении образцов крови в *одинаковых пространственных точках* и при *одинаковом числе делений* ядер в активных зонах в непрерывном и импульсном режимах работы реактора, является наиболее адекватной

для сравнительного изучения биологического действия смешанного  $\gamma$ -нейтронного излучения со сверхвысокой МД.

2. Импульсное нейтронное воздействие в режиме одиночных импульсов в исследованном диапазоне доз (0,5–2,5 Гр) и мощностей доз ((0,5–2,7)·10<sup>6</sup> Гр/мин) характеризуется относительно меньшим цитогенетическим эффектом по сравнению с непрерывным облучением ( $\leq 0,25$  Гр/мин), то есть проявляется обратный эффект мощности дозы.

3. Установленный обратный эффект сверхвысокой МД обусловлен процессами, протекающими на начальных (физико-химической и химической) стадиях радиационного воздействия, а также связан с существенным вкладом сопутствующего  $\gamma$ -излучения в суммарную дозу (~35–40%).

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные новые данные о закономерностях возникновения различных типов АХ в клетках человека при действии нейтронов со сверхвысокой МД, в сравнении с непрерывным их воздействием, вносят определенный вклад как в теоретическую, так и прикладную современную радиобиологию. Фундаментальное значение полученных фактов важно для понимания механизмов реализации первичных повреждений в клетках млекопитающих в зависимости от длительности радиационного воздействия, роли пространственной организации хромосом и взаимодействия индуцированных в них повреждений при действии смешанного  $\gamma$ -нейтронного излучения.

Проведенная оценка ОБЭ нейтронов реактора БАРС-6 в зависимости от режима облучения, в сопоставлении с ОБЭ близкого по средней энергии нейтронов пучка Б-3 реактора БР-10, свидетельствует об определенной специфике импульсного облучения, что необходимо учитывать при терапевтическом применении нейтронов. ОБЭ нейтронов по выходу асимметричных хромосомных обменов, с учетом их однозначного соотношения с симметричными обменами, может быть использована для оценки канцерогенных и мутагенных последствий облучения.

Результаты исследований позволили впервые получить радиобиологические параметры для оценки норм радиационной безопасности при работе в условиях воздействия импульсного нейтронного излучения.

Полученные данные могут быть использованы в научных исследованиях учреждений, занимающихся проблемой биологического действия различных видов ионизирующих излучений, а также в медицинских учреждениях при использовании лучевой нейтронной терапии.

**Публикации и апробация работы.** Результаты исследований опубликованы в 10 научных работах. Основные положения работы доложены на IV съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2001); III съезде по радиационным исследованиям «Радиобиология и радиоэкология» (Киев, 2003); 15<sup>th</sup> International Biophysics Congress «Environmental Biophysics» (Каир, 2005); V съезде по радиационным исследованиям «Радиобиология, радиоэкология, радиацион-

ная безопасность» (Москва, 2006); 4<sup>th</sup> international Workshop on Space Radiation Research and 17<sup>th</sup> Annual NASA Space Radiation Health Investigators' Workshop (Москва – Санкт-Петербург, 2006).

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции экспериментального сектора ГУ – МРНЦ РАМН 20 сентября 2007 г. (протокол № 16).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав, содержащих собственные экспериментальные данные и их обсуждение, выводов, указателя цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 157 стр., иллюстрирована 8 таблицами и 46 рисунками. Библиографический указатель содержит 75 работ на русском языке и 136 – на английском.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования выполнены на культуре лимфоцитов периферической крови человека в стадии покоя  $G_0$  полумикрометодом. Кровь для экспериментов получали от 2-х клинически здоровых доноров-мужчин в возрасте 28 и 36 лет. Для учета АХ использовали метафазный метод. Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов хромосом проводили в соответствии с общепринятыми международными протоколами. При анализе метафазных пластинок руководствовались требованиями, предложенными в монографии Бочкова Н.Н. (1971). Анализировали весь спектр АХ без проведения общего кариотипирования. На одну экспериментальную точку анализировали не менее 100 метафаз.

Исследование эффектов МД нейтронного излучения проводили на реакторе БАРС-6 ФГУП ГНЦ РФ – ФЭИ ( $E_n = 0,3 \div 0,5 \text{ МэВ}$  в позициях облучения). Длительность облучения составляла в режиме одиночных импульсов 65–70 мкс (на полувысоте импульса), что обеспечивало МД  $(0,5–2,7) \cdot 10^6$  Гр/мин, и в непрерывном режиме –  $\approx 60$  мин при МД  $\leq 0,25$  Гр/мин. Число делений ядер топлива в активных зонах (АЗ) реактора в парных опытах было несколько ниже (на 3–6,5%) в непрерывном режиме работы, чем в импульсном.

Цельную кровь по 3 мл облучали в пластмассовых пробирках нефилтрованным излучением с интервалом 24 ч в *одних и тех же* позициях в реакторном зале в обоих режимах, обеспечивая этим одинаковые физико-дозиметрические условия, кроме времени облучения (рис. 1). Дозы варьировали изменением расстояния от АЗ реактора от 6,5 до 18 м. В одном парном эксперименте образцы с кровью облучали при температуре тающего льда ( $0^\circ\text{C}$ ) и комнатной ( $20^\circ\text{C}$ ).

Цитогенетические эффекты излучения реактора БАРС-6 сравнивали с эффектами стандартного  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  (установка «Луч», МД  $\approx 0,5$  Гр/мин) и нейтронов терапевтического пучка Б-3 реактора БР-10 ФГУП ГНЦ РФ – ФЭИ ( $E_n = 0,85 \text{ МэВ}$ , МД=0,22 Гр/мин). Образцы с кровью облучали в воздухе в помещении терапевтического блока за медицинским коллиматором.

Дозиметрию излучения реактора БАРС-6 осуществляли с помощью не-

скольких экспериментальных и расчетных методов. Поток нейтронов измеряли активационными детекторами из никеля, трековыми детекторами деления из  $^{235}\text{U}$ ,  $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{237}\text{Np}$ ,  $^{238}\text{U}$  (ВНИИФТРИ) со слюдяными регистраторами. Восстановление спектра и кермы нейтронов проводили методом параметрического представления спектра нейтронов. Для измерения доз  $\gamma$ -излучения были использованы термолюминесцентные дозиметры ИКС-А, расчетная программа MCNP на основе метода Монте-Карло применялась для расчета радиационных характеристик поля излучения в помещениях реактора БАРС-6.

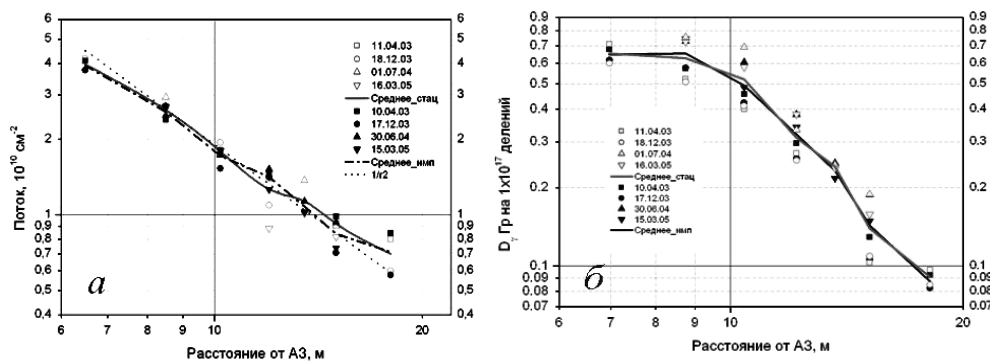


Рис. 1. Физико-дозиметрические характеристики излучения реактора БАРС-6 (нормировка на  $1 \cdot 10^{17}$  делений, одинаковыми значками обозначены показания детекторов в парных экспериментах): *a* – поток нейтронов и *б* – доза  $\gamma$ -излучения в импульсном (заполненные значки) и непрерывном (открытые значки) режимах облучения.

Погрешность дозиметрии ( $P=0,95$ ) составляла  $\leq 10\%$  для  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$ ,  $\leq 30\%$  – для сопутствующего  $\gamma$ -излучения на реакторах БАРС-6 и БР-10,  $\leq 15\%$  и  $\leq 30\%$ , соответственно, для нейтронов реактора БР-10 и БАРС-6.

При обработке экспериментальных данных использовали стандартные методы статистического анализа. Соответствие эмпирического распределения АХ по клеткам пуассоновскому оценивали с помощью  $u$ -критерия. Достоверность полученных результатов и значимость их различий между собой оценивали с помощью  $t$ -критерия,  $\chi^2$ -критерия, с использованием логистической и множественной линейной регрессии, дисперсионного анализа ( $F$ -критерий), а также других параметрических и непараметрических критериев различия, реализованных в пакетах прикладных программ по статистике для персональных ЭВМ: Статистика 6.0, SPSS 10.0, S-PLUS 2000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Сравнение цитогенетических эффектов импульсного и непрерывного излучения реактора БАРС-6

Главная особенность проведенных экспериментов заключается в том, что при облучении образцов крови в импульсном и непрерывном режимах работы реактора изменялся только один параметр – время облучения. Поскольку облучение в обоих режимах проводилось в одинаковых пространственных точках и при практически одинаковом числе делений в АЗ, это позволило наиболее

Исследованный диапазон доз нейтронов составлял 0,5–2,5 Гр на реакторе БАРС-6, 0,25–3,0 Гр – на реакторе БР-10 при вкладе  $\gamma$ -излучения 35–40% и 10%, соответственно, и 1,0–4,0 Гр для  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$ .

корректно сравнивать их цитогенетические эффекты, причем безотносительно к абсолютной дозиметрии. Относительная же погрешность дозиметрии при этом составляет 2–4%. Сопоставление цитогенетических эффектов двух режимов облучения *на одних и тех же расстояниях* от АЗ реактора указывает на систематическое превышение эффекта для непрерывного режима облучения с МД  $\leq 0,25$  Гр/мин по сравнению с импульсным с высокой МД ( $\sim 10^6$  Гр/мин). Более наглядно различие в эффективности двух режимов облучения проявляется при анализе отношений величин отдельных цитогенетических показателей (рис. 2).

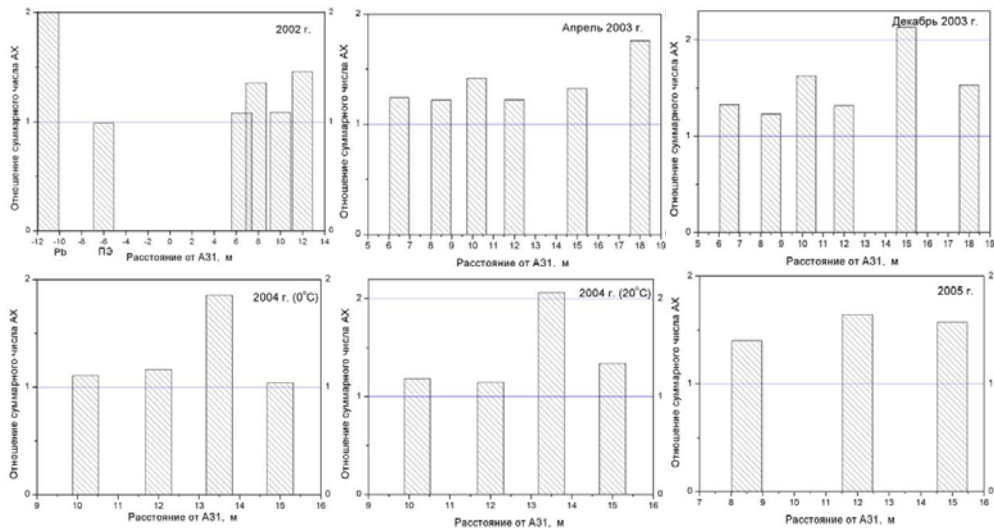


Рис. 2. Отношения суммарного числа АХ, индуцированных непрерывным и импульсным облучением в идентичных пространственных точках, нормированные на число делений ядер в активных зонах.

Различия в эффективности 2-х режимов облучения, оцениваемые по средней для всех экспериментов величине попарных отношений цитогенетических показателей, составили с учетом погрешностей числа АХ (весов реализации)  $1,26 \pm 0,05$  для числа поврежденных клеток,  $1,43 \pm 0,06$  – для суммарной частоты АХ,  $1,45 \pm 0,07$  – для частоты дицентриков и  $1,13 \pm 0,04$  – для интерстициальных делеций. Статистический анализ с использованием логистической и множественной линейной регрессии показал высокозначимое различие эффектов однократного импульсного и пролонгированного облучения ( $p < 0,001$ ). При этом величина отношений не зависела от МД в исследованном диапазоне МД нейтронов  $(0,3-2,6) \cdot 10^6$  Гр/мин.

Цитогенетические эффекты обоих режимов облучения сравнивали также в зависимости от показаний никелевого детектора (кермы быстрых нейтронов, рис. 3, а, б), и в зависимости от расстояний между образцами и АЗ реактора (рис. 3, в, г). Данные аппроксимировали линейной и линейно-квадратичной зависимостями выхода АХ в первом случае и линейной – во втором. Из соотношения линейных коэффициентов уравнений регрессии непрерывный режим облучения более эффективен, чем импульсный: по общей частоте АХ – в 1,23 раза по линейной модели и в 1,36 раза по линейно-квадратичной модели; по частоте дицентриков – в 1,31 раза по линейной модели и 1,65 – раза по линейно-квадратичной модели; в 1,25 раза – по общей частоте АХ для зависимостей от расстояния. Различия коэффициентов значимы по t-критерию ( $p < 0,001$ ).

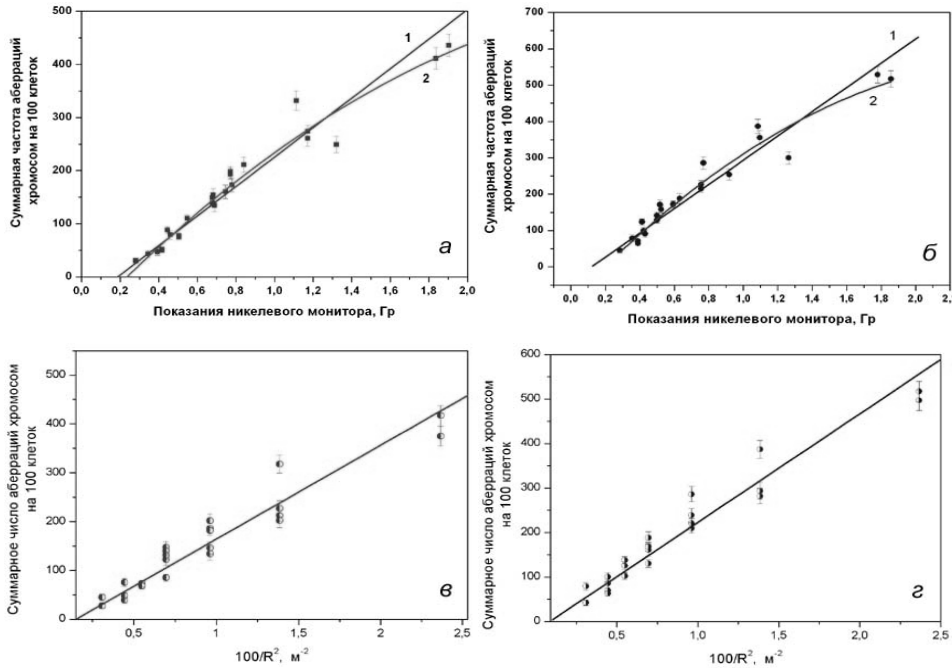


Рис. 3. Суммарные данные по общей частоте АХ для 2-х режимов облучения в зависимости от показаний никелевого детектора

(а – импульсный, б – непрерывный режим облучения) и от расстояний от образцов до АЗ реактора (в – импульсный, г – непрерывный режим облучения).

Таким образом, анализ цитогенетических результатов в зависимости от показаний никелевого детектора и от расстояния до АЗ реактора также подтвердил сделанный выше вывод о значимом различии 2-х режимов облучения.

С целью оценки влияния процессов восстановления повреждений хромосом на обнаруженные различия в цитогенетической эффективности импульсного и пролонгированного облучения был проведен специальный эксперимент, в

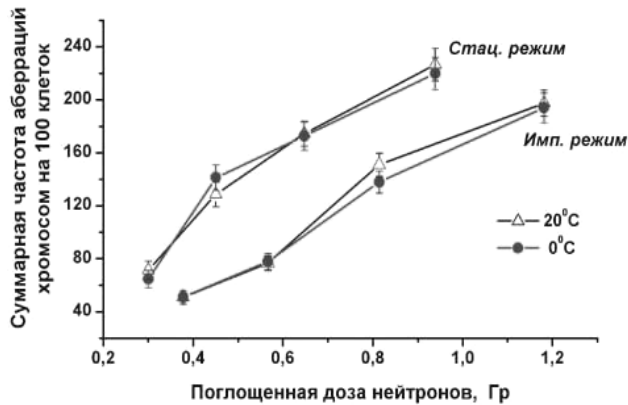


Рис. 4. Выход АХ в лимфоцитах человека, облученных в импульсном (имп) и непрерывном (стац) режимах при комнатной температуре и 0°C.

ходе которого лимфоциты во время облучения, а также до (3 ч) и после него (2 ч) находились при комнатной температуре (20°C) или температуре тающего льда (0°C), ингибирующей ферментативные процессы в клетке. Было установлено (рис. 4), что цитогенетическая эффективность импульсного и непрерывного излучения, оцениваемая по суммарной частоте АХ, не зависела от температуры (0°C или 20°C), при которой происходило облучение. Аналогичные результаты получены для частоты дицентриков. При этом различия в действии импульсного и непрерывного облучения наблюдались при температуре тающего льда (0°C) так же, как и при комнатной (20°C). Это позволяет предположить, что разное количество повреждений, ведущих к образованию аберраций хромосом, реализуется на стадиях, предшествующих биохимической, вероятно, на начальных физико-химической и химической стадиях, которые завершаются за время действия импульса облучения.

Таким образом, сопоставление цитогенетической эффективности непрерывного и однократного импульсного  $\gamma$ -нейтронного излучения в адекватных условиях облучения на реакторе БАРС-6 свидетельствует об их достоверном различии: облучение со сверхвысокой МД ( $\sim 10^6$  Гр/мин) оказывает сравнительно меньшее повреждающее действие на хромосомы покоящихся лимфоцитов человека, чем пролонгированное с МД на 7 порядков меньше, т.е. наблюдается обратный эффект МД (ЭМД).

### **Дозовые зависимости выхода аберраций хромосом при действии импульсного и непрерывного реакторных излучений и стандартного $\gamma$ -излучения**

В настоящем исследовании сравнивали цитогенетические эффекты нейтронов реактора БАРС-6 и терапевтического пучка Б-3 реактора БР-10, который за многие десятилетия исследований стал своего рода стандартом нейтронных излучений. Для количественного сравнения данные по всем экспериментам на реакторе БАРС-6 были объединены и сопоставлены с аналогичными эффектами на реакторе БР-10. Следует отметить, что построение дозовых кривых для импульсного излучения при использованной схеме экспериментов, строго говоря, неправомерно, т.к. каждая дозовая точка характеризовалась своей МД. В непрерывном же режиме облучения, несмотря на изменения на разных расстояниях от АЗ и МД, и средней энергии спектра нейтронов и соотношения доз нейтронов и  $\gamma$ -излучения, их величины ( $\pm 15\%$  от средних значений) не оказывают заметного влияния на цитогенетический эффект (Жербин Е.А. и др., 1984), и построение дозовых кривых возможно.

Дозовые кривые для суммарной частоты АХ, суммы дицентриков и центрических колец, частоты интерстициальных делеций для излучения реактора БР-10 и БАРС-6 в непрерывном режиме соответствовали линейной зависимости (рис. 5). Для процента поврежденных метафаз дозовые зависимости имели вид кривых с насыщением, характерных для этого цитогенетического показателя.

Анализ дозовых кривых для непрерывного режима облучения на реакторе БАРС-6 и сходство закономерностей образования разных типов АХ при облучении на реакторах БАРС-6 и БР-10 показали, что сделанные предположения о незначительном влиянии изменений спектра нейтронов на обоих реакторах и относительного вклада в дозу  $\gamma$ -излучения являются достаточно обоснованными. Это позволило не учитывать указанные факторы и в случае импульсного воздействия. Кроме того, независимость, точнее незначительность, обратного ЭМД от дозы и МД в исследованном диапазоне доз и мощностей доз дала возможность построения дозовых кривых и для импульсного режима облучения реактора БАРС-6.

Дозовые зависимости для импульсного излучения со сверхвысокой МД (рис. 6) характеризуются в целом такими же закономерностями, как и при действии непрерывного излучения: линейной зависимостью для суммарной частоты АХ, частоты дицентриков и центрических колец и числа интерстициальных делеций, кривой с насыщением – для числа поврежденных метафаз.

Сопоставление цитогенетических эффектов для излучений реакторов БАРС-6 и БР-10 (рис. 5, 6) показывает, что эффективность нейтронов возрастает в порядке: БАРС-6 (импульсный режим) – пучок Б-3 (непрерывный режим) – БАРС-6 (непрерывный режим) – как по суммарной частоте АХ, так и по частоте дицентриков. Однако необходимо отметить приближенный характер такого ко-

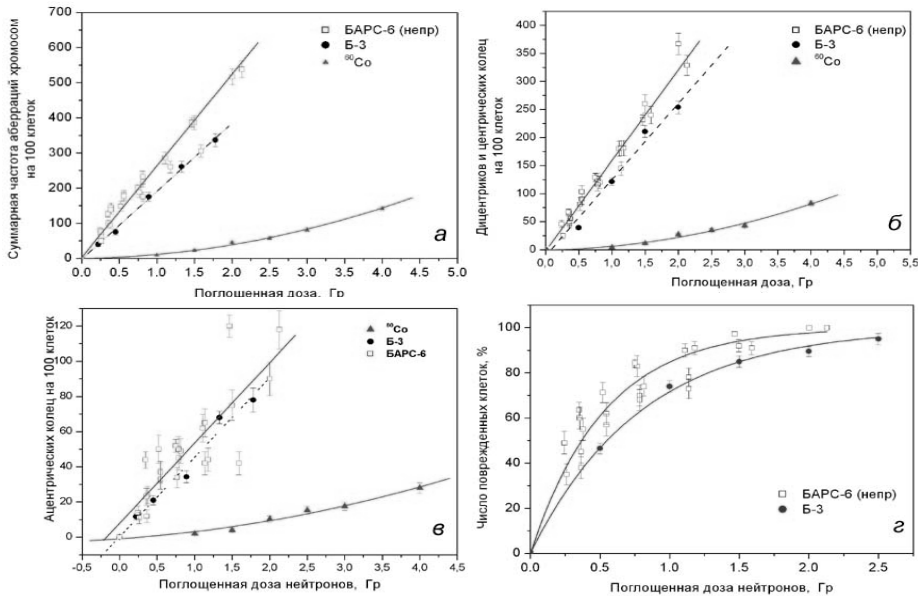


Рис. 5. Дозовые зависимости суммарной частоты АХ (а), числа дицентриков и центрических колец (б), числа интерстициальных делеций (в) и числа поврежденных метафаз (г) для  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  ( $\blacktriangle$ ) излучений реакторов БР-10 ( $\bullet$ ) и БАРС-6 в непрерывном режиме работы ( $\square$ ).

личественного сопоставления, имея в виду достаточную неопределенность дозиметрии на реакторе БАРС-6, которая оценивается в  $\approx 30\%$ . Различия в эффективности нейтронов пучка Б-3 и реактора БАРС-6 составляют при использо-

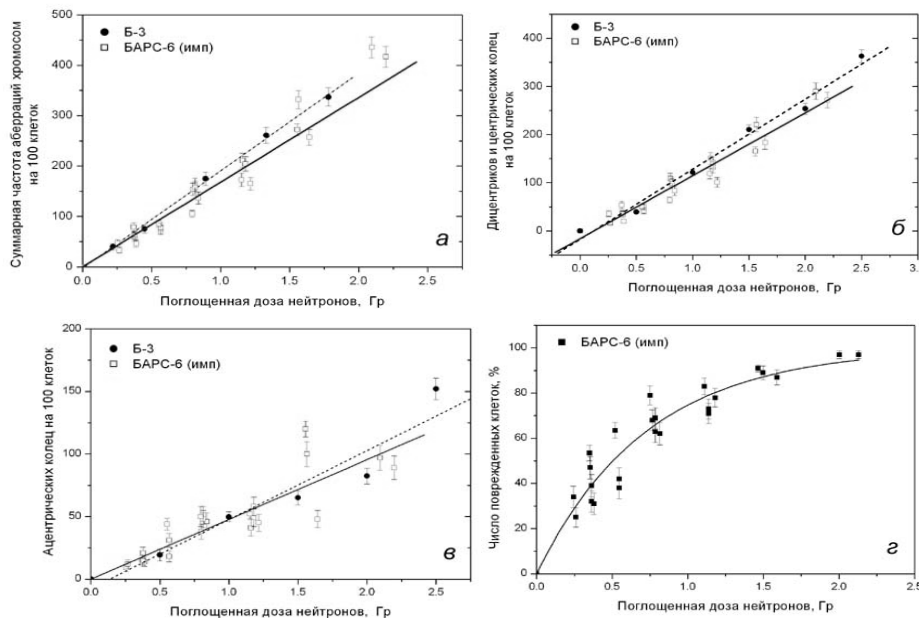


Рис. 6. Дозовые зависимости суммарной частоты АХ (а), числа дицентриков и центрических колец (б), числа интерстициальных делеций (в) и числа поврежденных метафаз (г) для излучений реакторов БР-10 и БАРС-6 в импульсном режиме работы.

ванных оценках доз от 10 до 30% и сопоставимы с погрешностью дозиметрии.

Таким образом, представленные в данном разделе результаты показывают, что излучение реактора БАРС-6 и в импульсном, и в непрерывном режиме облучения характеризуется линейным выходом как суммарного числа АХ, так и их отдельных типов, что можно интерпретировать как преимущественное обра-

зование АХ всех типов по одноклеточному механизму. Аналогичные закономерности наблюдаются и для «стандартного» нейтронного излучения пучка Б-3 реактора БР-10, в то время как для стандартного  $\gamma$ -излучения дозовые кривые в основном являются линейно-квадратичными.

### Коэффициенты ОБЭ нейтронов реакторов БАРС-6 и БР-10

Дозовые кривые, полученные для трех типов реакторного излучения и стандартного  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  позволяют оценить такую важную биологическую характеристику излучения, как его ОБЭ. Расчет коэффициентов ОБЭ (табл. 1) проводили в двух вариантах: 1) для заданного уровня эффекта, который выбирали равным 0,5 и 1 АХ на клетку для суммарной частоты АХ и 0,25; 0,5 и 1 АХ на клетку для частоты дицентриков; 2) для таких уровней эффекта, которые соответствовали дозам  $\gamma$ -излучения 0,5; 1,0; 2,0 Гр.

Таблица 1. Коэффициенты ОБЭ для реакторных излучений при разных уровнях цитогенетического эффекта

Суммарная частота АХ						
Вид излучения	Уровень эффекта, АХ/клетку					
	0,25	0,5	1	0,042 (0,5 Гр)*	0,123 (1,0 Гр)*	0,404 (2,0 Гр)*
Б-3	–	9,4	6,637	23	16	9,7
БАРС-6 непрер	–	11,187	7,911	27,8	19	11,5
БАРС-6 имп	–	8,865	6,268	22	15	9,3
Дицентрики и центрические кольца						
Вид излучения	Уровень эффекта, АХ/клетку					
	0,25	0,5	1	0,013 (0,5 Гр)*	0,052 (1,0 Гр)*	0,206 (2,0 Гр)*
Б-3	12,162	8,6	6,081	53	27	13
БАРС-6 непрер	13,836	9,784	6,918	61	31	15
БАРС-6 имп	9,342	6,606	4,671	41	21	10

\* – Дозы  $\gamma$ -излучения, для величины эффекта которых оценивали величины ОБЭ

Данные табл. 1 подтверждают высокую эффективность реакторных нейтронов. По суммарной частоте АХ и по частоте дицентриков и центрических колец величина коэффициентов ОБЭ варьирует в достаточно близком диапазоне, соответственно 6,3–11,2 и 4,7–13,8. В соответствии с их цитогенетической эффективностью величина коэффициентов ОБЭ возрастает в порядке БАРС (импульсный режим) – Б-3 – БАРС (непрерывный режим). Обращает на себя внимание, что при расчете коэффициентов ОБЭ, исходя из доз  $\gamma$ -излучения, получены довольно высокие значения при дозе 0,5 Гр, около 50 и выше по частоте дицентриков. В то же время при дозе 2 Гр значения коэффициентов ОБЭ согласуются с таковыми для уровня 0,25 АХ на клетку, что неудивительно, учитывая число дицентриков и центрических колец ( $\approx 0,2$ ) при этой дозе.

Таким образом, с учетом поглощенных доз нейтроны реактора БАРС-6 близки по цитогенетической эффективности и значениям коэффициентов ОБЭ к нейтронам пучка Б-3 и заметно превышают эффективность  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$ .

## Спектры aberrаций хромосом при действии $\gamma$ -нейтронного излучения импульсного реактора БАРС-6 и реактора БР-10

Во всех проведенных в данной работе экспериментах в спектре АХ преобладали aberrации хромосомного типа, что характерно для лимфоцитов, облученных в стадии  $G_0$ . Число aberrаций хроматидного типа для 4-х исследованных излучений составляло около 3 %.

При действии реакторных нейтронов дозовые кривые выхода отдельных типов АХ описывались линейными зависимостями, поэтому спектр АХ не зависел от дозы. Дозовые кривые для  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  описывались зависимостями, близкими к квадратичным как для суммарной частоты АХ, так и для дицентриков, но и в этом случае спектр АХ не зависел от дозы. Следует отметить общую закономерность, характерную для спектров АХ всех 4-х излучений: основной вклад в спектр АХ дают дицентрики, за ними следуют интерстициальные делеции. Наименьший вклад в спектр АХ дают центрические кольца и парные фрагменты, причем вклад последних в спектры АХ всех излучений минимален.

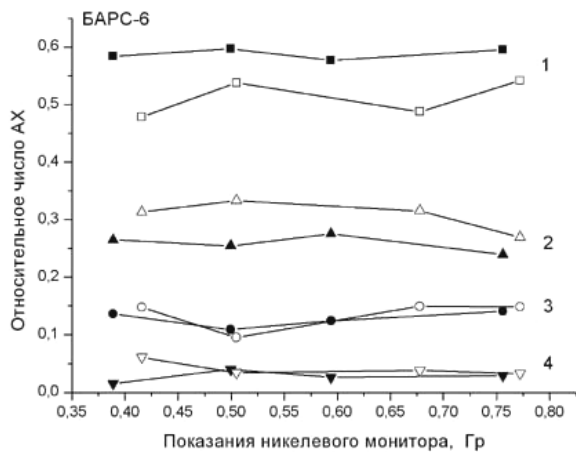


Рис. 7. Спектр АХ при облучении на реакторе БАРС-6 в непрерывном (заполненные значки) и импульсном режимах (открытые значки): 1 – дицентрики; 2 – интерстициальные делеции; 3 – центрические кольца; 4 – парные фрагменты.

При анализе спектра АХ для излучения БАРС-6 обращает на себя внимание определенное перераспределение отдельных типов АХ в зависимости от режима облучения (рис. 7). Видно, что если относительный вклад центрических колец и парных фрагментов не зависит от режима облучения, то при импульсном облучении наблюдается относительное увеличение числа внутривлеечных обменов – интерстициальных делеций (точек, ацентрических колец) за счет снижения межхромосомных обменов (дицентриков). Это подтверждается и разной величиной снижения числа дицентриков и интерстициальных делеций при увеличении МД до  $\approx 10^6$  Гр/мин, соответственно в 1,45 и 1,13 раза.

### Распределение aberrаций хромосом по клеткам

Анализ распределения суммарной частоты АХ и частоты дицентриков по клеткам показал их зависимость от вида изученных излучений. Так, относительная дисперсия стандартного  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  для суммарной частоты АХ ( $\sigma^2/\bar{y}=1,1\pm 0,06$ ) и для частоты дицентриков ( $\sigma^2/\bar{y}=1,02\pm 0,067$ ) не отличается значимо от 1 ( $u < 1,96$ ). Это свидетельствует о пуассоновском характере распределения АХ по клеткам. При облучении на пучке Б-3 реактора БР-10 распределения суммарной частоты АХ ( $\sigma^2/\bar{y}=1,4\pm 0,04$ ) и дицентриков ( $\sigma^2/\bar{y}=1,36\pm 0,082$ ) во

всех дозовых точках отличались от пуассоновского ( $u > 2,56$ ). При действии излучения реактора БАРС-6 в большинстве случаев относительная дисперсия распределений АХ по клеткам превышает 1 (рис. 8), хотя это отличие не всегда является значимым ( $u < 1,96$ ).

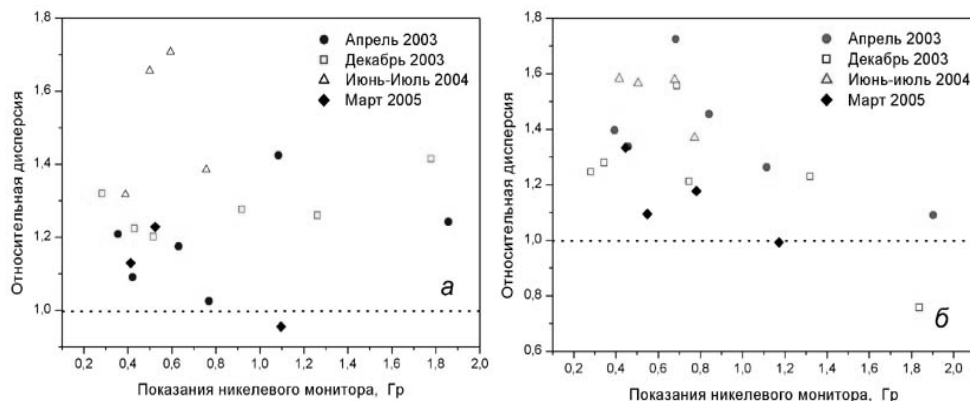


Рис. 8. Относительные дисперсии распределений суммарной частоты АХ по клеткам при облучении на реакторе БАРС-6 в непрерывном (а) и импульсном (б) режимах.

Заметных различий между непрерывным режимом облучения и импульсным со сверхвысокой МД по рассматриваемым показателям не наблюдалось. Так, усредненные по всем экспериментальным точкам значения относительной дисперсии распределений по суммарной частоте АХ составляют соответственно  $1,22 \pm 0,024$  и  $1,26 \pm 0,042$  и находятся между таковыми для стандартных нейтронного и  $\gamma$ -излучения. Это может свидетельствовать о влиянии сопутствующего  $\gamma$ -излучения, вклад которого значителен для излучения реактора БАРС-6 (35–40 %). Для дицентриков наблюдалось пуассоновское распределение для непрерывного режима облучения ( $\sigma^2/\gamma=1,053 \pm 0,053$ ) и промежуточное (между данными для Б-3 и  $^{60}\text{Co}$ ) по величине относительной дисперсии распределение для импульсного излучения ( $\sigma^2/\gamma=1,28 \pm 0,048$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассмотренные результаты исследований показали, что при сравнении эффективности двух режимов облучения на реакторе БАРС-6 в наиболее адекватных условиях, когда изменялся только исследуемый параметр – длительность облучения, наблюдаемый выход АХ в лимфоцитах крови человека в стадии  $G_0$  при однократном импульсном нейтронном облучении со сверхвысокой МД  $(0,5–2,7) \cdot 10^6$  Гр/мин оказался сравнительно ниже, чем при непрерывном облучении нейтронами в «обычном» диапазоне МД ( $\leq 0,25$  Гр/мин). Этот эффект достоверно ( $p < 0,001$ ) проявлялся по основным цитогенетическим показателям: количеству поврежденных метафаз, суммарной частоте АХ и суммарной частоте дицентриков и центрических колец. Наименьшие различия наблюдались для интерстициальных делеций ( $0,01 < p < 0,05$ ).

Аналогичные результаты получены на клетках китайского хомячка в логарифмической фазе роста по тестам выживаемости и индукции мутаций резистентности к 6-тиогуанину: при облучении нейтронами деления ( $E_n = 0,75 \text{ МэВ}$ ) в обычном (МД – 0,96 сГр/мин) и импульсном ( $10^4$  Гр/мин в импульсе) режимах

различия составили соответственно 1,4 и 1,9 раза (Елисова Т.В., 1988). В то же время в работах, выполненных в аналогичных условиях на реакторе БАРС-6, наблюдали либо бóльшую эффективность импульсного облучения (АХ в клетках костного мозга мышей, Рябченко Н.И., 2005), либо одинаковую с непрерывным (дрожжи *Saccharomyces* с различным генотипом, бактерии *E.coli*, Цыб Т.С., 1998; 2007). Следует, однако, отметить, что в цитируемых работах облучение проводили или *in vivo* (мыши), или в другом диапазоне МД, или на другом виде клеток (дрожжи), что и могло привести к разным наблюдаемым эффектам.

Анализ особенностей и возможных механизмов действия импульсного излучения со сверхвысокой МД (а) рекомбинация продуктов радиолиза воды, б) физико-химическая и в) ферментативная репарация, г) «выгорание» кислорода, д) тепловой, гидродинамический или акустический удар, е) эффекты насыщения, ж) смешанное  $\gamma$ -нейтронное облучение) и полученные результаты показали, что в исследованном диапазоне доз и МД можно исключить влияние факторов в, г, и в, определенной степени, а, тогда как оценка роли остальных представляет сложную задачу, для решения которой необходимо проведение специальных экспериментальных и модельно-теоретических исследований.

В качестве возможного объяснения полученных результатов можно предположить, что при облучении в непрерывном режиме начальная доза сопутствующего  $\gamma$ -излучения вызывает равномерное образование ОР в молекулах ДНК (хроматине), и последующую релаксацию ее сверхскрученных петель (Пелевина И.И., 1985). Вследствие деспирализации хроматина при непрерывном облучении образуется больше повреждений ДНК на единицу дозы (Warters R., 1992), но пространственно они располагаются дальше друг от друга. Это, в конечном счете, приводит к большей эффективности непрерывного режима по сравнению с импульсным, хотя эффект близости, проявляющийся в относительном увеличении числа интерстициальных делеций, отсутствует. По-видимому, релаксация ДНК вследствие образования ОР эффективно протекает и при температуре 0°C, о чем свидетельствует отсутствие различий в эффективности облучения при 0°C и 20°C. При импульсном облучении все три процесса –  $\gamma$ -облучение, нейтронное облучение и релаксация хроматина – происходят одновременно, поэтому, вероятно, за счет эффектов насыщения в конечном итоге образуется меньше повреждений, чем при непрерывном облучении. Напротив, можно предположить, что комбинированное действие  $\gamma$ -излучения, нейтронного излучения, деспирализации ДНК, гидроакустического удара при импульсном облучении приводит к образованию в хромосомах (ДНК) большого количества повреждений, так что процессы их восстановления (реституции) благодаря эффекту «близости» преобладают над процессами ошибочной репарации. В результате, как и при облучении в высоких дозах  $\gamma$ -излучения, выход АХ будет меньше, хотя повреждений ДНК было больше. С последним предположением, возможно, согласуется перераспределение обменных АХ в пользу интерстици-

альных делеций при импульсном облучении, которое означает, что образуется больше близкорасположенных разрывов, что возможно при большем общем их количестве. (Роль предсуществующих контактов хромосом для образования интерстициальных делеций и деконденсации и движения хроматина для образования дицентриков подчеркивается в диссертации Эйдельмана Ю.А., 2007).

Вопрос о роли сопутствующего  $\gamma$ -излучения в эффектах реакторного нейтронного излучения требует дополнительного изучения. Так, расчеты по биофизической модели предсказывают дополнительный цитогенетический эффект за счет взаимодействия повреждений от нейтронного и  $\gamma$ -компонентов, который составляет на расстояниях 6,5 и 10 м соответственно 15 и 30% суммарного эффекта (Филимонов А.С., 2001). На определенную роль  $\gamma$ -излучения в цитогенетическом эффекте излучения БАРС-6, возможно, указывают и результаты анализа распределения АХ по клеткам, поскольку при действии излучения реактора БАРС-6 относительная дисперсия распределений характеризовалась промежуточным значением между пуассоновским для  $\gamma$ -излучения и резко отличным от него «сверхдисперсным» для «чистых» нейтронов пучка Б-3.

В практическом плане важно отметить, что нейтроны реактора БАРС-6 и терапевтического пучка Б-3 не отличаются резко по величине ОБЭ – максимально на  $\pm 20\%$ . Различия обусловлены МД, отличавшейся в  $\approx 5 \cdot 10^7$  раз, и спектрами, средняя энергия которых близка к наиболее эффективной 0,35 МэВ.

Для оценки мутагенного эффекта нейтронов значительный интерес представляет величина их ОБЭ по выходу дицентриков. Обусловлено это тем, что, как убедительно показано в работах с использованием метода FISH, число соответствующих симметричных и асимметричных обменов практически совпадает: дицентриков и транслокаций, центрических колец и перицентрических инверсий, ацентрических колец и парацентрических инверсий. Величины ОБЭ исследованных нейтронов, рассчитанные по выходу дицентриков, в общем выше, чем рассчитанные по суммарной частоте АХ. Таким образом, нейтроны, более эффективные по летальному действию (суммарная частота АХ), оказываются более эффективными и в мутагенном действии. При этом импульсное нейтронное воздействие, вызывая меньшее повреждение клеток по сравнению с пролонгированным, оказывается менее опасным и в мутагенном отношении.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана методология проведения парных экспериментов на реакторе БАРС-6, включающая облучение *in vitro* лимфоцитов крови человека в импульсном и непрерывном режимах работы *на одних и тех же расстояниях* от активных зон реактора и *при одинаковом числе делений* ядер в активных зонах, позволяющая наиболее корректно оценивать биологическую эффективность сравниваемых видов нейтронного облучения.
2. Установлен обратный цитогенетический эффект сверхвысокой мощности дозы при действии излучения реактора БАРС-6 на лимфоциты крови человека в исследованном диапазоне доз (0,5–2,5 Гр) и мощностей доз  $((0,5–2,7) \cdot 10^6$

Гр/мин). Его величина (отношение эффективностей непрерывного и импульсного режимов облучения) зависит от исследованного цитогенетического показателя – максимальна для частоты дицентриков и суммарной частоты aberrаций хромосом, составляя 1,45 и 1,43, соответственно, и минимальна для числа поврежденных клеток и частоты интерстициальных делеций – 1,26 и 1,13, а также не зависит от температуры (0° и 20°С) во время облучения.

3. Дозовые кривые действия излучения реактора БАРС-6 в импульсном и непрерывном режимах, так же как и излучения пучка Б-3 реактора БР-10, характеризовались линейными зависимостями как по выходу суммарного числа aberrаций хромосом, так и их отдельных типов, что свидетельствует о преимущественно внутритрековом механизме их образования и незначительности вклада сопутствующего  $\gamma$ -излучения в цитогенетический эффект.

4. Установлено различие в спектре aberrаций хромосом при разных режимах облучения на реакторе БАРС-6 – перераспределение межхромосомных и внутриплечевых обменов в пользу последних при импульсном облучении по сравнению с непрерывным.

5. Распределения aberrаций хромосом и дицентриков по клеткам при действии смешанного  $\gamma$ -нейтронного излучения реактора БАРС-6 не зависели от вида облучения (импульсного или непрерывного), характеризовались отличным от пуассоновского распределением aberrаций по клеткам и занимали промежуточное положение по величине средней относительной дисперсии между сверхдисперсным распределением для излучения пучка Б-3 реактора БР-10 и пуассоновским распределением  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$ .

6. ОБЭ трех видов исследованных реакторных излучений – непрерывного (МД  $\leq 0,25$  Гр/мин) и импульсного со сверхвысокой мощностью дозы ( $\sim 10^6$  Гр/мин) реактора БАРС-6 и пучка Б-3 реактора БР-10 (МД  $\approx 0,1$  Гр/мин) – в зависимости от уровня цитогенетического эффекта (0,01–1 aberrация на клетку) варьируют соответственно в диапазоне 13–60, 10–42 и 11–53 для суммарной частоты aberrаций хромосом и 20–80, 15–70, 17–75 для частоты дицентриков, не отличаясь значимо один от другого.

7. На основании анализа всей совокупности полученных результатов обосновывается гипотеза, что наблюдаемый обратный эффект сверхвысокой мощности дозы обусловлен процессами, протекающими на начальных (физико-химической и химической) стадиях радиационного воздействия, а также связан с существенным вкладом сопутствующего  $\gamma$ -излучения в суммарную дозу ( $\sim 35$ –40%).

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Корякина Е.В., Севаньяев А.В., Потетня О.И., Потетня В.И., Соколов В.А., Ульяненко С.Е. Цитогенетическое действие импульсного нейтронного излучения со сверхвысокой мощностью дозы на лимфоциты человека: Тез. докл. 4 съезд по радиационным исследованиям. – Москва, 2001. – Т.3. – С.723.
2. Филимонов А.С., Потетня О.И., Потетня В.И., Корякина Е.В. Теоретический

анализ цитогенетического действия импульсного  $\gamma$ -нейтронного излучения реактора БАРС-6: Там же. – Т.3. – С.726.

3. Корякина Е.В., Потетня В.И., Севанькаев А.В., Потетня О.И. Цитогенетическое действие излучения импульсного реактора БАРС-6 в режиме непрерывного воздействия и импульсного со сверхвысокой мощностью дозы на лимфоциты человека: Тез. докл. III съезд по радиационным исследованиям (радиобиология и радиоэкология). – Киев, 2003. – С. 96.

4. Севанькаев А.В., Корякина Е.В., Потетня В.И., Потетня О.И., Соколов В.А., Ульяненко С.Е. Цитогенетический эффект импульсного излучения нейтронов с энергией 14,5 МэВ в лимфоцитах человека: Тез. докл. Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 25-летию НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН. – Современное состояние и перспективы развития экспериментальной и клинической онкологии. – Томск, 2004.

5. Корякина Е.В., Севанькаев А.В., Потетня В.И., Потетня О.И., Соколов В.А., Ульяненко С.Е. Оценка влияния параметров импульсного нейтронного излучения на выход аберраций хромосом в лимфоцитах человека: Тез. докл. II Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика 2005» – Москва, 2005. – С. 40–41.

6. Корякина Е.В., Севанькаев А.В., Потетня В.И., Потетня О.И. Цитогенетическое действие излучения импульсного реактора БАРС-6 в режиме непрерывного воздействия и однократного импульсного со сверхвысокой мощностью дозы на лимфоциты человека // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45, № 4. – С. 405–411.

7. Koryakina E.V., Potetnya V.I., Potetnya O.I., Baikuzina R.M., Sevan'kaev A.V. The cytogenetic effects of impuls gamma-neutron irradiation at ultrahigh dose rate: Abstracts of Cairo Satellite Meeting of the 15<sup>th</sup> International Biophysics Congress «Environmental Biophysics». – Cairo, 2005.

8. Корякина Е.В., Потетня О.И., Потетня В.И., Байкузина Р.М. Обратный эффект сверхвысокой мощности дозы  $\gamma$ -нейтронного излучения импульсного реактора БАРС-6 по выходу аберраций хромосом в лимфоцитах человека: Тез. докл. V съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность). – Москва, 2006. – Т. III. – С. 62.

9. Sevan'kaev A.V., Potetnya V.I., Potetnya O.I., Koryakina E.V. Influence of high intracellular energy deposition on cytogenetic effects in human lymphocytes: Abstracts of 4<sup>th</sup> international Workshop on Space Radiation Research and 17<sup>th</sup> Annual NASA Space Radiation Health Investigators' Workshop (Moscow–St. Petersburg). – Dubna: JINR, 2006. – P. 120.

10. Севанькаев А.В., Потетня О.И., Потетня В.И., Корякина Е.В., Поздышкина О.В., Пятенко В.С. Влияние температуры на формирование аберраций хромосом в лимфоцитах крови человека при импульсном и стационарном режимах облучения на реакторе БАРС-6 // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 6. – С. 667–672.