

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО РАДИОБИОЛОГИЯ И
РАДИАЦИОННА ЗАЩИТА

АЛБЕНА ПЕТКОВА СТАЙНОВА

**БИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА ДОЗАТА ПРИ
РАДИАЦИОННА АВАРИЯ В БЪЛГАРИЯ. ВЪВЕЖДАНЕ НА
 γ – H2AX МЕТОД ЗА БИОДОЗИМЕТРИЯ ПРИ МАСОВИ
РАДИАЦИОННИ ИНЦИДЕНТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен
“ДОКТОР”

Научна специалност: Радиобиология, шифър 01.06.09

Научен ръководител: доц. Росица Христова, дм

Дисертационният труд съдържа 124 стандартни печатни страници, включва 19 фигури и 24 таблици. В библиографската справка са включени 162 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита на заседание на Научния колегиум при НЦРРЗ на 30.03.2021г.

Научното жури е утвърдено от Научния съвет на НЦРРЗ с протокол № 25/13.04.2021г.

Научно жури:

1. *Проф. Радостина Тенева Георгиева, дмн*
2. *Проф. д-р Пламен Стоянов Димитров, дм*
3. *Доц. д-р Жана Николаева Джунова-Великова, дм*
4. *Доц. Росица Петрова Христова, дм*
5. *Доц. Иванка Маринова Рупова-Танкова, дм*

Председател на журито:

Доц. Росица Петрова Христова, дм

Официални рецензенти:

Проф. Радостина Тенева Георгиева, дмн

Доц. д-р Жана Николаева Джунова-Великова, дм

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 06.07.2021г. от 13:00 часа в зала 225 на НЦРРЗ, гр. София, ул. „Св. Георги Софийски“ № 3, сграда 7

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Научно-учебен“ към НЦРРЗ.

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД	5
1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	9
3.1. Цитогенетичен анализ и биологична оценка на погълната доза при лицата, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски.....	9
3.2. Проследяване честотата на дицентрици и пръстени в лимфоцити от периферна кръв на лицата, пострадали при радиационна авария в гр. Стамболийски.....	17
3.3. Изграждане на зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси в зависимост от дозата γ -лъчи, на 4-ти и 24-ти час, след <i>in vitro</i> облъчване на изолирани лимфоцити.....	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	28
ИЗВОДИ	31
ПРИНОСИ	32
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ	33

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....33

Summary.....34

БЛАГОДАРНОСТИ

УВОД

Съвременното общество е свидетел на все по-голямото приложение на йонизиращото лъчение в различни сфери, което обаче е свързано и с повишаване на опасността от радиационни инциденти. Нарастващата нужда от източници на йонизиращо лъчение в промишлеността (стерилизация на храни, строителство, инженерство и др.) води до увеличаване на вероятността от загуба на източниците или неподходящото им използване и съхранение. Напредъкът в медицината дава възможност за по-широко приложение на йонизиращото лъчение. Извършваните процедури, обаче са значително по-сложни, което до известна степен увеличава рискът от радиационни инциденти. Неотдавнашните събития във Фукушима (Япония) напомнят за рисковете от облъчване в резултат на авария в атомните електроцентрали.

Всички тези случаи могат да доведат до инцидентно излагане на действието на йонизиращото лъчение на различен брой лица. Адекватното медицинско лечение и прогнозата на очакваните здравни ефекти при пострадалите, изисква бързо и точно да се оцени дозата на всички засегнати лица. Въпреки, че съществуват физични методи за измерване на дозата, от голямо значение е да се приложат и алтернативни методи, които да допринесат за по-точна оценка на погълнатата доза. Днес тази оценка се базира на изменението в броя на кръвните клетки и на възникналите клинични симптоми, в допълнение с резултатите, получени от биологичната дозиметрия. Биодозиметрията се състои в анализ на радиационно индуцирани изменения, които настъпват в клетката при остро и продължително облъчване. Редица параметри в човешкото тяло се променят с увеличаване на погълнатата доза. Това позволява дозата да бъде оценена с помощта на *in vitro* изградена зависимост доза-ефект, която отчита изменението на дадения ефект за определен дозов диапазон.

Много усилия бяха положени за разработването на ефикасен метод за биодозиметрия, който да включва минимален брой инвазивни процедури. За целта бяха проучени няколко биомаркера, базирани на биологичното действие на йонизиращото лъчение. За да служи като ефективен индикатор на дозата, маркерът трябва да отговаря на няколко изисквания: да бъде специфичен за йонизиращото лъчение; да има ниска спонтанна честота; да се прилага върху лесно достъпни клетки; честотата на изследваният биомаркер трябва да е в дозова зависимост в експонираните лица; да има добра съпоставимост между резултатите получени *in vitro* и *in vivo*. На тези изисквания отговарят

радиационно индуцираните дицентрици в лимфоцити от периферна кръв, които широко се използват в биологичната дозиметрия и се определят като “златен стандарт”. Приложимостта на дицентричния анализ за определяне на дозата и оценка на рисковете за здравето е доказана в няколко радиационни аварии – Чернобил, Гоияния, Токай-мура и др. Прогнозните дози, оценени с помощта на цитогенетичния анализ на нестабилни хромозомни аберации, корелират добре с тежестта на острия радиационен синдром.

Микронуклеус тестът в периферни лимфоцити е алтернатива на дицентричния анализ при определяне на дозата, тъй като микронуклеусите подобно на дицентриците нарастват в дозова зависимост в облъчените лица. Анализът на микронуклеуси, в допълнение към цитогенетичния анализ на дицентрици и пръстени, е използван за биодозиметрия на погълната доза в няколко радиационни инцидента – Истанбул, Гент; Хънан, Бялосток и др. В тези случаи дозите, оценени въз основа честотата на микронуклеуси и нестабилни хромозомни аберации, са с близки стойности.

При възникване на машабен радиационен инцидент, засягащ голям брой лица, нуждаещи се от медицински грижи, от изключително значение е да се направи бързо сортиране на населението през първите часове с цел идентифициране на най-сериозно засегнатите лица от тези получили пренебрежимо ниски дози. Присъщо, както за дицентричния анализ, така и за микронуклеус теста е необходимостта от култивиране на лимфоцитите в *in vitro* условия, съответно за 48 и 72 часа, за да се визуализира хромозомното увреждане. По тази причина първата оценка на дозата може да бъде налична най-рано на третия ден след пристигане на кръвната проба в лабораторията. Ето защо, тези методи не са подходящи при масови радиационни инциденти, когато от съществено значение е времето, необходимо за изпълнение на метода и определяне на дозата, а не прецизността при оценка на дозата.

Разработването на нови по-бързи и в същото време достатъчно ефикасни методи за оценка на погълнатата доза, които да елиминират ограниченията на досега съществуващите, е от голямо значение в биодозиметрията.

Потенциалните нови биоиндикатори включват няколко протеина, които участват в ранните етапи на клетъчния отговор след радиационно въздействие. Характерно за тези протеини е, че се активират в рамките на минути след облъчване, количеството им нараства с дозата йонизиращо лъчение и персистират в клетката до няколко дни след експозицията.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се оцени погълнатата доза йонизиращо лъчение на лица, пострадали в радиационна авария и да се проучи, оптимизира и валидира нов метод за биологична дозиметрия.

Постигането на тази цел изисква решаването на следните задачи:

1. Биологична оценка на дозата на пострадалите при радиационна авария в гр. Стамболийски, чрез конвенционален дицентричен анализ.
2. Биологична оценка на дозата на пострадалите при радиационна авария в гр. Стамболийски, чрез цитоконезис-блок микронуклеус тест.
3. Проследяване честотата на дицентрици и пръстени в лимфоцити от периферна кръв на пострадалите при аварията лица.
4. Изграждане на зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси, 4 часа след *in vitro* облъчване на лимфоцити с γ -лъчи.
5. Изграждане на зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси, 24 часа след *in vitro* облъчване на лимфоцити с γ -лъчи.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Биологична оценка на дозата при радиационна авария в гр. Стамболийски, 2011г.

Изследвана група лица

- Пет лица, засегнати в радиационна авария в гр. Стамболийски.

Цитогенетични методи за биодозиметрия

- Конвенционален метод за анализ на дицентрици и пръстени в лимфоцити;
- Цитокинезис-блок микронуклеус тест в бинуклеарни лимфоцити.

Статистически анализ

Статистическата обработка на отчетените стойности за честота на дицентрици, пръстени и микронуклеуси, с цел биологична оценка на получените дози, бе направена с помощта на програма Dose Estimate_v5.2.

Изграждане на зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси в зависимост от дозата γ -лъчи, на 4-ти и 24-ти час, след *in vitro* облъчване на изолирани лимфоцити

Клетъчни системи

- Лимфоцити, изолирани от периферна кръв на пет здрави донора.

Метод за детектиране на γ -H2AX/53BP1 фокуси

- Имунофлуоресцентно маркиране на белтъците γ -H2AX и 53BP1.

Статистически анализ

Честотата на γ -фокуси за всяка дозова точка, бе изчислена със статистическата програма Dose Estimate_v5.2. Получените резултати при всеки един от петте донора, бяха тествани за хомогенност с помощта на χ^2 -тест. Зависимостите доза-ефект бяха описани с линеен модел. Коефициентите на уравненията, описващи тези зависимости бяха изчислени с помощта на програмата Dose Estimate_v5.2.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

3.1. Цитогенетичен анализ и биологична оценка на погълната доза при лицата, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски

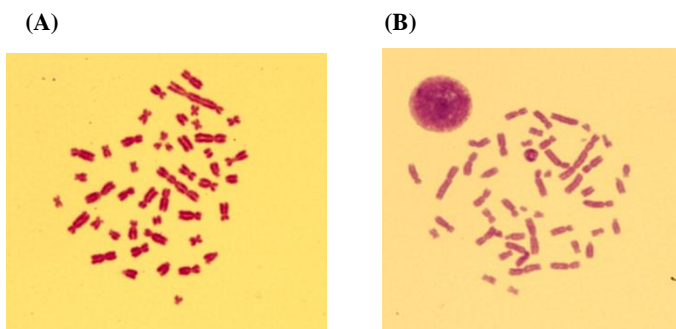
Здравните ефекти, възникващи в резултат на облъчване с йонизиращо лъчение, са пропорционални на погълнатата доза. За да се прогнозира последствията от радиационната експозиция и да се приложи правилното медицинско лечение, е необходимо да се оцени дозата на засегнатото лице. Цитогенетичният анализ на индуцирани нестабилни хромозомни аберации, в лимфоцити от периферна кръв на облъчени лица, се използва повече от 50 години в областта на биодозиметрията. Той се приема като най-подходящ при необходимост от детектиране на радиационно въздействие. Доказателство за значимостта на цитогенетичния хромозомен анализ, при изчисляване на дозата, е прилагането му в редица радиационни инциденти и аварии. Получената доза се оценява чрез сравняване на отчетената честота на хромозомни аберации с данните от стандартна зависимост доза-ефект, изградена чрез *in vitro* облъчване на човешки периферни лимфоцити. Анализът на хромозомни аберации се прилага, както в случаите на остро, така и при продължително въздействие на йонизиращо лъчение. Недостатък на този вид анализ е дългото време, необходимо за отчитане на достатъчен брой лимфоцити.

Йонизиращото лъчение индуцира образуване на микронуклеуси в човешките лимфоцити. Съществува тясна връзка между честотата на микронуклеуси и получената доза за определен дозов диапазон. Микронуклеусите в бинуклеарни лимфоцити са надежден биоиндикатор за радиационно въздействие, а анализът им е значително по-бърз и лесен в сравнение с дицентричния анализ.

На 14 юни 2011г. в гр. Стамболийски възниква тежка радиационна авария с гама-облъчвателна уредба. Причината е неразпозната грешна подредба на линейните елементи, заредени с източници, поради което в процеса на презареждане вместо “имитатор”, от защитния контейнер е изваден линейен елемент, зареден с 5 броя източници ^{60}Co (обща активност 137 ТВq към 14.06.2011г.). При аварията са засегнати пет лица на възраст между 44 и 78 години. Първият медицински преглед на лицата, пострадали при радиационната авария, бе извършен 40 часа след аварията, когато анамнестично бяха

регистрирани продромалните признаци и симптоми и бяха взети проби за пълна кръвна картина и биологична оценка на получените дози.

В настоящата работа бе приложен конвенционален анализ на хромозомни аберации и цитокинезис-блок микронуклеус тест за биологична оценка на погълната доза при засегнатите лица. При микроскопския анализ на стимулирани периферни лимфоцити от пострадалите лица бе наблюдавано наличието на различен брой дицентрици, пръстени и ацентрични фрагменти (Фигура 1).

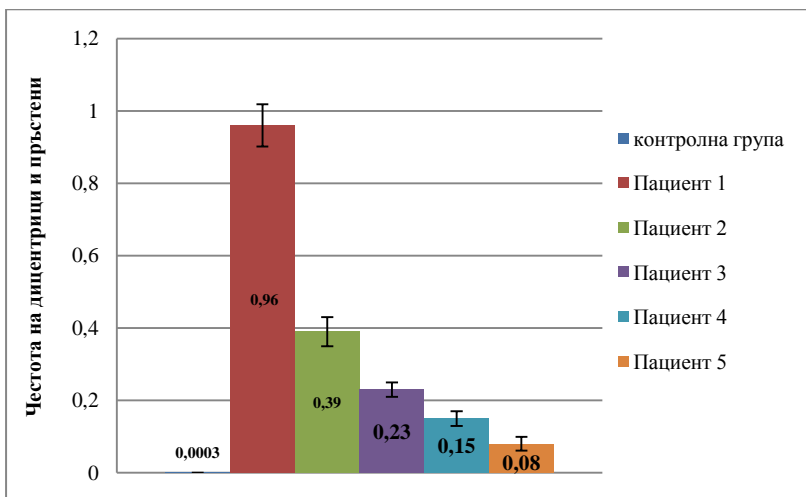


Фигура 1. (А) Метафазна пластинка с дицентрична хромозома, трицентрична хромозома и фрагменти. (В) Метафазна пластинка с трицентрична хромозома, пръстеновидна хромозома и фрагменти.

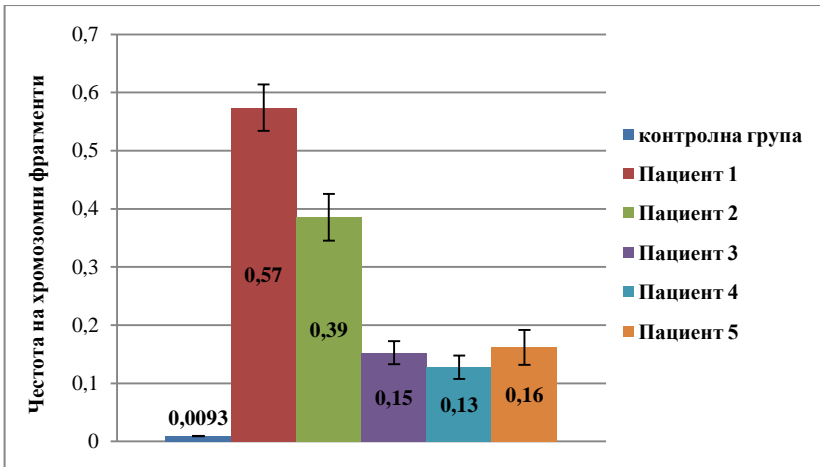
Класическият цитогенетичен метод за анализ на хромозомни аберации бе използван за определяне честотата на дицентрици и пръстени в лимфоцити от периферна кръв на пациентите. При хромозомния анализ бе отчетена и честотата на ацентрични фрагменти, които бяха наблюдавани в метафазните пластинки на засегнатите лица.

Честотите на дицентрици + пръстени, както и на хромозомни фрагменти, при пострадалите лица, бяха многократно по-високи от тези, отчетени за българската популация (Фигура 2) и (Фигура 3). Спонтанната честота на нестабилни хромозомни аберации, изчислена в контролна група от българската популация е 0,0003 аберации/клетка. За сравнение, честотата на дицентрици и пръстени, индуцирана в резултат на радиационната авария бе в диапазона между 0,08 и 0,96 аберации/клетка. Спонтанната честота на хромозомни

фрагменти, изчислена в контролна група от българската популация е 0,0093 фрагмента/клетка. Честотата на хромозомни фрагменти, индуцирана в резултат на радиационната авария бе в диапазона между 0,13 и 0,57 фрагмента/клетка. Значително по-високите нива на изследваните показатели свидетелства, че всяко едно от засегнатите лица е било изложено на повишено облъчване.

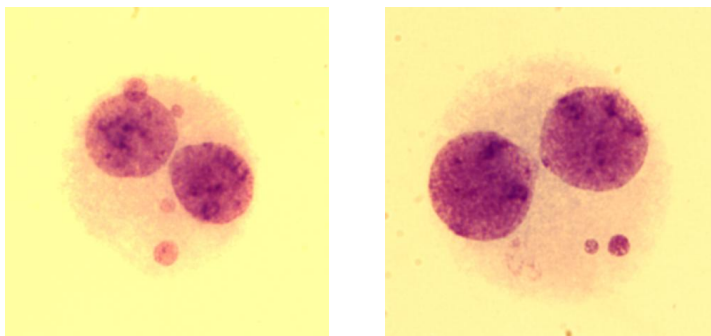


Фигура 2. Спонтанна честота на дицентрици и пръстени, отчетена в контролна група от българската популация и честота на дицентрици и пръстени \pm SE, анализирана при лицата, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски, 2011г.



Фигура 3. Спонтанна честота на хромозомни фрагменти, отчетена в контролна група от българската популация и честота на хромозомни фрагменти \pm SE, анализирана при лицата, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски, 2011г.

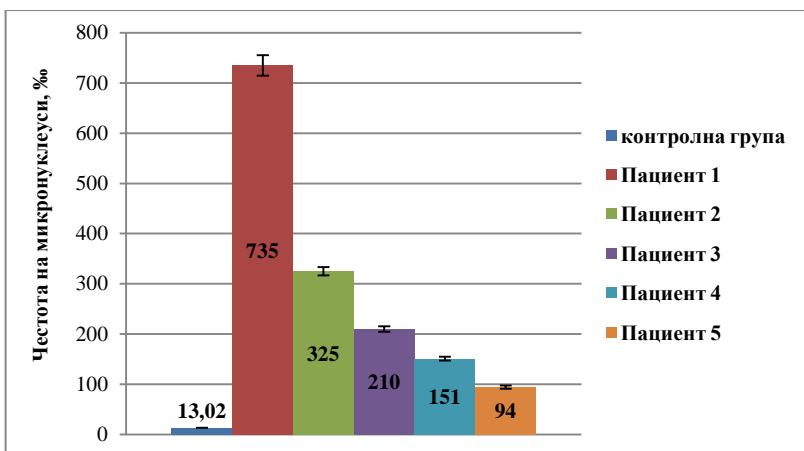
Редица проучвания върху различни групи пациенти, както и използването на микронуклеус тестът за определяне на получена доза, при няколко радиационни инцидента, показват значимостта на честотата на микронуклеуси за детектиране на радиационно въздействие. В настоящата работа ние приложихме цитокинезис-блок микронуклеус тестът, за да извършим биологична оценка на погълната доза. При микроскопския анализ на двудрени лимфоцити от пострадалите лица бе наблюдавано наличието на различен брой микронуклеуси (Фигура 4).



Фигура 4. Двуйдрени лимфоцити, съдържащи микронуклеуси в цитоплазмата си.

Методът бе използван за определяне честотата на микронуклеуси в лимфоцити от периферна кръв на лицата, засегнати в радиационната авария в гр. Стамболийски през 2011г.

Спонтанната честота на микронуклеуси, изчислена в контролна група от българската популация е 13,02%. Наблюдаваните честоти на микронуклеуси, при пострадалите лица, бяха значително по-високи от тази, отчетена за българската популация (Фигура 5). За сравнение, честотата на микронуклеуси, индуцирана в резултат на радиационната авария бе в диапазона между 94 и 735 %. Многократното повишение на изследвания биоиндикатор за радиационно въздействие показва, че лицата засегнати в аварията са били изложени на повишено облъчване с йонизиращо лъчение.



Фигура 5. Спонтанна честота на микронуклеуси, отчетена в контролна група от българската популация и честота на микронуклеуси \pm SE %, анализирана при лицата, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски, 2011 г.

Данните, получени от цитогенетичния анализ (сумарна честота на дицентрици и пръстени, както и честота на микронуклеуси в периферни лимфоцити), бяха използвани за биодозиметрия на погълнатата доза на пострадалите лица (Таблица 1).

Таблица 1. Сравнение на индивидуалните дози на пострадалите лица, оценени чрез различни методи за биодозиметрия (95% доверителен интервал).

Метод за оценка на получената доза	Пациент 1 доза, Gy (LCI-UCI)	Пациент 2 доза, Gy (LCI-UCI)	Пациент 3 доза, Gy (LCI-UCI)	Пациент 4 доза, Gy (LCI-UCI)	Пациент 5 доза, Gy (LCI-UCI)
Конвенционален хромозомен анализ	5,6	3,37	2,47	1,96	1,25
	(4,94 - 6,25)	(2,85 - 3,89)	(2,04 - 2,9)	(1,56 - 2,36)	(0,81 - 1,7)
Микронуклеус тест	5,22	3,22	2,37	1,84	1,22
	(5,03 - 5,42)	(2,98 - 3,45)	(2,13 - 2,60)	(1,59 - 2,07)	(0,98 - 1,46)

(LCI-UCI) – долна и горна граница на 95% доверителен интервал

Детектирането на голям брой дицентрици, пръстени и микронуклеуси при микроскопския анализ, води до значително намаляване на неопределеността при биологична оценка на получената доза. Стойностите на дозите, оценени по двата метода, са съпоставими. Дозите изчислени чрез анализ на нестабилни хромозомни аберации са в диапазона 1,25 – 5,6 Gy, а тези получени чрез анализ на микронуклеуси са в диапазона 1,22 – 5,22 Gy. Подобна съпоставимост между дозите, получени чрез анализа на дицентрици и микронуклеуси, е наблюдавана в няколко случая на аварийно облъчване. При радиационен инцидент в Истанбул, Турция през 1998г. е извършена биологична оценка на дозата при 10 лица, облъчени от източник ^{60}Co . Дозите, оценени чрез анализ на дицентрици и пръстени са в диапазона 0,6 – 3,1 Gy, а дозите оценени чрез анализ на микронуклеуси са в диапазона 0,7 – 2,7 Gy. При радиационен инцидент в Shanxi Taiyuan, Китай през 2008г., пет лица са изложени на γ -лъчи от източник ^{60}Co . Дозите на пострадалите лица, оценени чрез анализ на дицентрици и пръстени са в диапазона 2,1 – 12,4 Gy, а дозите оценени чрез анализ на микронуклеуси са в диапазона 2,3 – 20 Gy. При радиационен инцидент в Henan Province, Китай през 1999г., биологична дозиметрия е извършена при три лица, облъчени от източник ^{60}Co . Дозите на пострадалите лица, оценени чрез анализ на дицентрици и пръстени са в диапазона 2,48 – 5,61 Gy, а дозите оценени чрез анализ на микронуклеуси са в диапазона 2,78 – 5,45 Gy. Близките стойности на дозите, оценени чрез прилагане на двата метода показва, че микронуклеус тестът и цитогенетичният анализ на дицентрици и пръстени в периферни лимфоцити, са надеждни методи за биодозиметрия след аварийно облъчване с йонизиращо лъчение.

В настоящата работа, ние изчислихме дозите на облъчените лица, след анализ на различен брой лимфоцити, за да установим как броя на отчетените клетки влияе върху точността на оценената доза, както и върху диапазона на доверителния интервал. Биодозиметрия бе извършена трикратно – след първоначален анализ на 50 клетки, след това на 100 клетки и последната оценка на дозата бе направена след окончателно изброяване на отчитаемите клетки, т.е. между 210 и 376 клетки (Таблица 2).

Таблица 2. Оценка на погълната доза целотелесно равномерно облъчване, след анализ на различен брой лимфоцити, при лицата пострадали в радиационната авария.

Пациент	Брой отчетени клетки	Общ брой дицентрици+ пръстени	Оценена доза	95% CI (Gy) LCI-UCI
1	50	41	5,14 Gy	4,28 - 6,07
	100	95	5,57 Gy	4,96 - 6,21
	284	272	5,60 Gy	5,23 - 5,97
2	50	21	3,54 Gy	2,68 - 4,49
	100	37	3,29 Gy	2,68 - 3,95
	249	96	3,37 Gy	2,98 - 3,77
3	50	10	2,30 Gy	1,45 - 3,28
	100	23	2,49 Gy	1,89 - 3,16
	367	83	2,47 Gy	2,15 - 2,80
4	50	8	2,01 Gy	1,17 - 3,00
	100	13	1,76 Gy	1,18 - 2,44
	376	58	1,96 Gy	1,65 - 2,29
5	50	2	0,8 Gy	0,13 - 1,88
	100	6	1,07 Gy	0,51 - 1,77
	210	16	1,25 Gy	0,85 - 1,71

CI – доверителен интервал

LCI-UCI – долна и горна граница на 95% доверителен интервал

Получените резултати показаха, че индивидуалните дози, оценени след анализ на различен брой лимфоцити са много близки. Разликите между трите изчислени дози, при всяко едно от лицата, бяха в рамките на 0,5Gy, което се допуска, когато се прави първоначална оценка на получената доза. Настоящото проучване потвърждава, че броя на анализирани клетки оказва голямо влияние върху границите на 95% доверителен интервал. От резултатите описани в Таблица 3 се вижда, че с увеличаване на броя анализирани лимфоцити,

намалява диапазона между горната и долната граница на този интервал, както е описано в литературата.

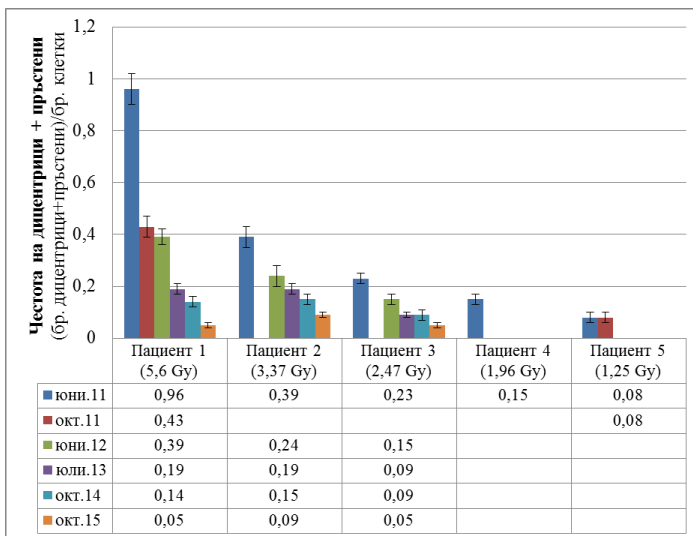
При цитогенетичния анализ, направен 40 часа след аварията, бе отчетено разпределението на дицентрици и пръстени, както и на микронуклеуси в лимфоцити от периферна кръв на засегнатите лица. Данните показаха наличието на дозова зависимост в процентното съдържание на клетки с повече от един дицентрик или пръстен, при пострадалите в радиационната авария. Съответно при най-сериозно засегнатото лице – **Пациент 1**, процентът на лимфоцити, с множество нестабилни хромозомни аберации, бе най-голям (44%), а при лицето получило най-ниска доза – **Пациент 5**, процентът бе най-малък (7%). Дозово зависимо повишение, бе наблюдавано и по отношение на процентното съдържание на клетки с повече от един микронуклеус – при **Пациент 1**, процентът на лимфоцити, с множество микронуклеуси бе най-висок (31%), а при **Пациент 5**, процентът бе най-нисък (11%). Подобна дозова зависимост описват и авторите, анализирали радиационно индуцирани нестабилни хромозомни аберации, както и микронуклеуси при три лица, получили дози между 2 и 5Gy при аварийно облъчване в провинция Хънан, Китай.

3.2. Проследяване честотата на дицентрици и пръстени в лимфоцити от периферна кръв на лицата, пострадали при радиационна авария в гр. Стамболийски

Хромозомните аберации, каквито са дицентриците и пръстените, са най-чувствителния индикатор, използван в областта на биодозиметрията. Трудности при оценка на дозата възникват, когато става въпрос за минало радиационно въздействие, тъй като лимфоцитите, носители на такива изменения постепенно отпадат от кръвния поток, което от своя страна води до понижение в честотата им. Персистирането на радиационно индуцирани нестабилни хромозомни аберации, в човешка периферна кръв, е обект на много спорове в научната общност, тъй като няма достатъчно налична информация и резултатите от проследяването на такива пострадали са ограничени. Според различни проучвания, отпадането на тези аберации се описва с експоненциална функция, а времето, за което първоначалната честота на дицентрици намалява наполовина е 3 години. Някои автори твърдят, че съществува начален период на стръмно понижение в честотата на аберациите, след радиационна експозиция, следван от период на бавно понижение. Тези резултати вероятно се дължат на наличието на

различни субпопулации от лимфоцити, с различна продължителност на живот. В действителност, точната връзка между честотата на дицентрици и времето след облъчване не е напълно изяснена.

Методът за цитогенетичен анализ на дицентрици и пръстени бе приложен при част от пострадалите лица, с цел проследяване изменението в честотата на радиационно индуцираните нестабилни хромозомни аберации. Изследвания период обхваща времето от първото вземане на кръвни проби за биологична оценка на дозата (40 часа след аварията) до месец октомври 2015г. (Фигура 6).



Фигура 6. Честота на нестабилни хромозомни аберации (дицентрици + пръстени/клетка) в лимфоцити, на лицата пострадали в радиационната авария, анализирана за периода от 2011г. до 2015г.

Четири месеца след аварията първоначалната честота на дицентрици и пръстени, при лицето получило най-висока доза (**Пациент 1**), бе понижена с 55%, докато при лицето получило най-ниска доза (**Пациент 5**), тази честота остава непроменена. Данните показват, че при **Пациент 1** (5,6 Gy), темпото с което се е понижила честотата на нестабилни хромозомни аберации, през първата година (особено през първите четири месеца) след аварията, е

значително по-бързо, в сравнение с темпото, което бе наблюдавано през останалия период. При **Пациент 2** (3,37 Gy) и **Пациент 3** (2,47 Gy) отново най-голямо понижение в честотата на дицентрици и пръстени бе наблюдавано през първата година след аварията, като редуцирането е съответно с 38% и 35%. Една година след радиационната авария все още бе наблюдавана дозова зависимост в сумарната честота на радиационно индуцирани дицентрици и пръстени. Това означава, че колкото по-висока е получената доза, толкова по-голяма е честотата на нестабилни хромозомни аберации. През следващите три години, понижението в честотата на дицентрици и пръстени при тези лица продължава, но значително по-бавно, в сравнение с понижението, което бе наблюдавано през първата година след аварията.

Проследяването на нестабилните аберации при **Пациент 1**, **Пациент 2** и **Пациент 3**, показва наличието на две фази в промяната на честотата им – период на бързо и период на бавно понижение. При **Пациент 1** (5,6 Gy) бе наблюдавано най-съществено редуциране, като в рамките на първата година след аварията, честотата на дицентрици и пръстени бе понижена с 59%. Вероятната причина за това е тежкото облъчване, на което е било изложено лицето. В резултат на получената висока доза, при този пациент бе наблюдаван най-сериозен спад в броя на лимфоцитите. Анализът на кръвната картина, извършен на 6-тия ден след радиационната авария, показва 86% понижение в техния брой, спрямо личните референтни стойности на това лице (Djounova et al., 2012). Нормално, спадът в лимфоцитите води до интензивна митотична активност в клетките, предшественици на лимфоцитите. В процеса на лечение, включващ използването на растежни фактори, се стимулира образуването на нови лимфоцити, от неувредени стволови клетки, несдържащи дицентрици и пръстени. Вероятно този процес води до намаляване в честотата на радиационно индуцирани нестабилни хромозомни аберации в периферната кръв. В рамките на първата година след радиационната авария, при **Пациент 2** (3,37 Gy) и **Пациент 3** (2,47 Gy), също бе наблюдаван начален период на по-съществено редуциране в честотата на дицентрици и пръстени, но по-слабо изразено в сравнение с **Пациент 1**. При тези две лица, подобно на **Пациент 1**, бе регистрирано радиационно индуцирано понижение в броя на лимфоцитите, на което до голяма степен се дължи спадът в честотата на нестабилни хромозомни аберации. Анализът на кръвната картина, извършен на 6-тия ден, показва редуциране в броя на лимфоцитите с 78% и 64%, спрямо личните референтни стойности, съответно при **Пациент 2** и **Пациент 3**.

В края на изследвания период (4 години след радиационната авария), резултатите показваха съществена разлика в зависимост от дозите, които са

получили пострадалите лица. При пациента с най-висока доза (5,6 Gy), честотата на аберациите бе понижена в най-голяма степен, достигайки до 5% от първоначалната честота. При другите две изследвани лица, получили по-ниски дози (3,37 и 2,47 Gy), честотата бе редуцирана, съответно до 23 и 22% спрямо първоначалната стойност. Независимо от понижението в честотата на радиационно индуцираните нестабилни хромозомни аберации, четири години след аварията, тя все още бе значително по-висока от спонтанната честота за българската популация.

Проследяването на честотата на нестабилни хромозомни аберации, при лицата засегнати в радиационна авария в гр. Стамболийски, както и резултатите описани в литературата показват, че сумарната честота на дицентрици и пръстени се редуцира с времето след облъчване. Това означава, че лимфоцитите, съдържащи такъв тип хромозомни изменения се елиминират от циркулиращата кръв, което от своя страна води до понижение в тяхната честота. Някои проучвания установяват, че времето, за което първоначалната честота на аберации намалява наполовина е 3 години. При аварийни ситуации свързани с високи дози, когато обикновено става дума за парциално облъчване, периодът за който първоначалната честота на аберации намалява наполовина е в рамките на 1 година, което е в съгласие с резултатите, получени в настоящото проучване.

Има няколко възможни обяснения за изменението в честотата на дицентрици и пръстени, с времето след облъчване. Една от причините е възстановителния процес, след радиационно индуцирана левкопения, който е свързан с образуване на нови лимфоцити от родоначални клетки в костния мозък. Навлизането на тези нормални клетки в периферната кръв води до „разреждане“ на клетките, съдържащи аберации. Възможно е също така, клетките с дицентрици и пръстени да се елиминират с времето, поради наличието на други видове хромозомни изменения, в същите клетки, които са летални. Друга вероятна причина е наличието на субпопулации от Т-лимфоцити с кратък живот, чието отпадане от кръвния поток отразява началния период на бързо понижаване в честотата на аберациите и наличието на субпопулации от Т-лимфоцити с дълъг живот – отразяват продължителния период на бавно понижаване в честотата на хромозомни изменения.

Изясняването на проблема, засягащ персистирането на нестабилни хромозомни аберации в периферна кръв е от изключителна важност, особено в случаите, когато има забавяне при вземането на кръвни проби за биодозиметрия, напр. повече от няколко седмици.

Резултатите, описани в настоящата работа, обясняват отчасти несъответствията сред авторите относно времето, за което първоначалната

честота на нестабилните хромозомни аберации намалява наполовина. Вероятно най-голямо значение за продължителността му има дозата, получена по време на облъчване.

3.3. Изграждане на зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси в зависимост от дозата γ -лъчи, на 4-ти и 24-ти час, след *in vitro* облъчване на изолирани лимфоцити

В ситуация на масова радиационна авария, бързото идентифициране на лицата, изложени на високи дози йонизиращо лъчение, е от първостепенно значение за първоначален триаж и вземане на решения за медицинско лечение. Цитогенетичната дозиметрия, включваща анализ на дицентрични хромозоми, е надежден метод за биологична оценка на дозата, допълваща или алтернативна на физичната дозиметрия. Този метод обаче има две основни ограничения: 1) необходим е период от 48 часа, за култивиране на лимфоцити и получаване на метафазни пластинки и 2) анализът на хромозомни увреждания, причинени от йонизиращата радиация, отнема доста време и са необходими отлични професионални умения. Това налага нуждата от алтернативни методи за биодозиметрия, които да са лесни, бързи и приложими при мащабни радиационни инциденти.

Един от ефектите, които йонизиращото лъчение предизвиква в клетката е образуване на двойноверижни разкъсвания в молекулата на ДНК. Възникването им води до серия от клетъчни отговори, включващи фосфорилиране на хистоновия белтък H2AX в големи хроматинови области, заобикалящи разкъсванията. От своя страна фосфорилираният белтък (γ -H2AX) служи като депо за свързване на други сигнални фактори, един от които е 53BP1, които също участват в поправката на ДНК. Тези области, съдържащи стотици молекули γ -H2AX и 53BP1, могат да се наблюдават скоро след облъчване като вътреядрени огнища или т. нар. фокуси.

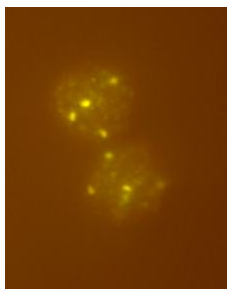
През последното десетилетие, белтъкът γ -H2AX и p53-свързващия протеин (53BP1) се утвърдиха като биомаркери за детектиране на радиационно индуцирани увреждания в ДНК. Създаването на флуоресцентни антитела, специфични за γ -H2AX и 53BP1, позволи да се разработи чувствителен метод, с който микроскопски да се визуализират и количествено да се определят местата на двойноверижни разкъсвания, след радиационно въздействие. Методът е използван за детектиране на ДНК увреждания при пациенти с радио- и/или

химиотерапия. В няколко *ex vivo* проучвания се обсъжда и потенциалната му роля за точна оценка на дозата в рамките на часове или няколко дни след експозиция. Обещаващи са и резултатите, получени от прилагането на метода за биодозиметрия след облъчване на примати. Ограничен е обаче, броя на случаите, в които методът е използван за оценка на дозата, след *in vivo* облъчване на хора.

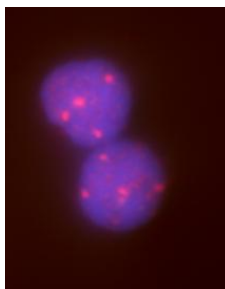
Количеството на γ -H2AX фокуси намалява с времето след облъчване, което отразява кинетиката на репаративните процеси. Понижението в честотата на γ -фокуси е лимитиращ фактор, който частично може да бъде избегнат чрез изграждане на зависимост доза-ефект, за оценка на дозата, на различни часови интервали. При условия на реален радиационен инцидент е важно да се знае с максимално приближение какъв е периода между облъчването и вземането на кръвните проби, за да се приложи съответната зависимост, изработена за такъв час. Практиката показва, че периодът между 4-тия и 24-тия час е времеви прозорец, през който е най-вероятно да бъде взета кръв на засегнатите лица за определяне на дозата. По тази причина, в настоящата работа, ние избрахме да изградим две зависимости доза-ефект – на 4-тия час след *in vitro* облъчване (определя се като най-ранния час, в който може да се вземе кръв при радиационен инцидент) и на 24-тия час след *in vitro* облъчване (определя се като оптимален час, в който може да се вземе кръв при радиационен инцидент).

За изграждане на двете зависимости бяха използвани лимфоцити, изолирани от венозна кръв на пет донора и облъчени *in vitro* с дози 1, 2 и 3 Gy γ -лъчи. След инкубационен период, съответно от 4 и 24 часа, бе извършено имунофлуоресцентно оцветяване и с помощта на микроскоп бе анализирана честотата на радиационно индуцираните γ -H2AX/53BP1 фокуси. В *in vitro* облъчени лимфоцити, γ -H2AX и 53BP1 фокусите бяха колокализирани (Фигура 7), а честотата им показва дозово-зависимо повишение, което бе наблюдавано при всеки един от донорите.

γ -H2AX фокуси



53BP1 фокуси

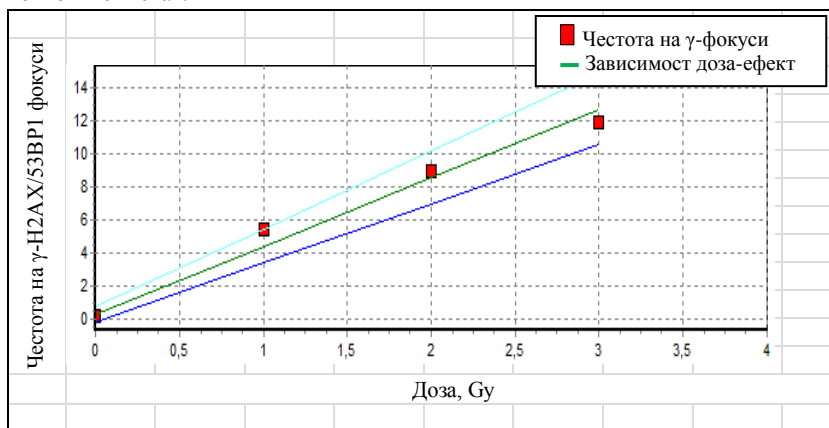


DAPI



Фигура 7. Иммунофлуоресцентно локализиране на γ -H2AX и 53BP1 в човешки лимфоцити, 4 часа след *in vitro* облъчване с 0,5Gy γ -лъчи. DAPI – оцветяване на ядрата с 4', 6-диамидино-2-фенилиндол.

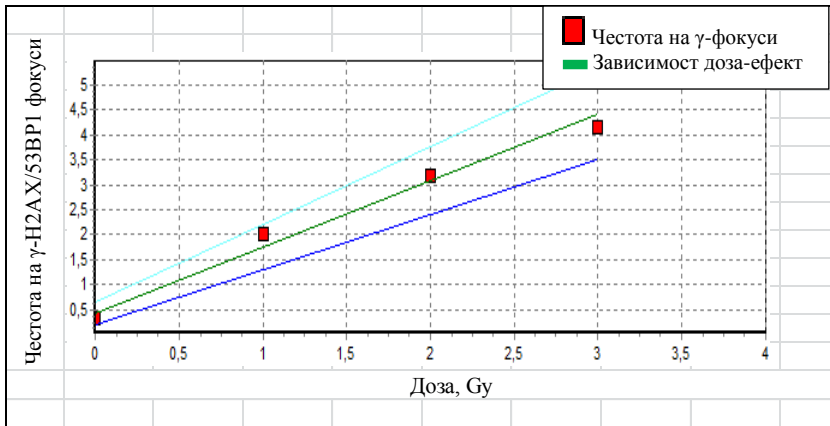
Получените резултати бяха обработени с помощта на статистическата програма Dose Estimate_v5.2, чрез която бяха изградени двете зависимости доза-ефект (Фигура 8 и Фигура 9) и бяха изчислени коефициентите на уравненията, които ги описват.



Фигура 8. Зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси с дозата йонизиращо лъчение, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване на лимфоцити с 1, 2 и 3 Gy γ -лъчи. Сините линии показват горната и долната граница на 95% доверителен интервал.

Уравнението, което описва зависимостта доза-ефект, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване има вида:

$$Y = 0,2999 (\pm 0,2314) + 4,1490 (\pm 0,2891) * D$$



Фигура 9. Зависимост доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси с дозата йонизиращо лъчение, изградена на 24-тия час след *in vitro* облъчване на лимфоцити с 1, 2 и 3 Gy γ -лъчи. Сините линии показват горната и долната граница на 95% доверителен интервал.

Уравнението, което описва зависимостта доза-ефект, изградена на 24-тия час след *in vitro* облъчване има вида:

$$Y = 0,4191 (\pm 0,1156) + 1,3320 (\pm 0,1169) * D$$

Честотата на γ -фокуси, анализирана на 4-тия и 24-тия час след *in vitro* облъчване, нараства линейно с дозата йонизиращо лъчение до 3 Gy (Фигура 8 и Фигура 9), както е описано в литературата. Направено бе сравнение между радиационно индуцираната честота на γ -фокуси, която се е запазила след 4-часов и съответно 24-часов инкубационен период (Таблица 3).

Таблица 3. Сравнение между честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси, анализирана на 4-ти и 24-ти час, след *in vitro* облъчване на лимфоцити от периферна кръв с γ -лъчи.

Доза	Честота на γ -фокуси \pm SE, 4 часа след <i>in vitro</i> облъчване	Честота на γ -фокуси \pm SE, 24 часа след <i>in vitro</i> облъчване
1 Gy	5,47 \pm 0,11	2,01 \pm 0,06
2 Gy	8,95 \pm 0,13	3,19 \pm 0,08
3 Gy	11,99 \pm 0,15	4,17 \pm 0,09

Съпоставянето на резултатите показва, че количеството γ -H2AX/53BP1 фокуси, което остава на 24-тия час след *in vitro* облъчване в дозовия диапазон 1-3 Gy γ -лъчи, се е редуцирало приблизително 3 пъти, в сравнение с честотата, анализирана на 4-тия час (Таблица 21, $p < 0,01$). Това понижение отразява ефекта на времето, изминало след облъчване, върху честотата на γ -фокуси, която се редуцира поради протичаща репарация на двойноверижните разкъсвания в ДНК. Според литературни данни, спонтанната честота на γ -фокуси в необлъчени лимфоцити варира в диапазона 0,05 – 0,5 фокуса/клетка. Честотата на γ -фокуси, която бе анализирана на 24-тия час, след облъчване с доза 1 Gy (2,01 фокуса/клетка) бе около шест пъти по-висока в сравнение с честотата, отчетена в необлъчени лимфоцити (0,31 фокуса/клетка). Въпреки наблюдаваното понижение в честотата на γ -H2AX/53BP1, след 24-часов инкубационен период, значителна част от γ -фокусите, индуцирани в дозовия диапазон 1 – 3 Gy, бяха запазени ($p < 0,03$).

Наличието на дозова зависимост в честотата на γ -H2AX/53BP1, която бе отчетена след 24 часов инкубационен период (Фигура 9) предполага, че след първоначалната бърза загуба на фокуси следва фаза на по-бавно редуциране в честотата им, което от своя страна води до запазването им за по-продължителен период от време. В проучване, свързано с *in vitro* облъчване на лимфоцити с X-лъчи, се наблюдава линейна дозова зависимост в честотата на γ -фокуси между 24 и 96 часа след облъчване с дози 0,5; 1 и 4 Gy. Тези резултати показват, че γ -H2AX/53BP1 фокусите биха могли да се използват като биомаркер в рамките на няколко дни след облъчване, макар и с променяща се чувствителност на метода, както и необходимост от прилагане на зависимости доза-ефект, изградени през

различни часови интервали. Информация за точния час на облъчване би била от решаващо значение за всяка оценка на дозата, базирана на анализ на радиационно индуцирана честота на γ -фокуси.

В настоящата работа ние установихме, че анализът на γ -H2AX/53BP1 фокуси, чрез флуоресцентен микроскоп, позволява да бъдат разграничени доза 0 Gy (без последици за здравето), доза 1 Gy (прагова доза за възникване на остър радиационен синдром), доза 2 Gy и 3 Gy (потенциално летална доза). Това показва, че методът за анализ на γ -фокуси притежава необходимата чувствителност и използването му в условия на масова радиационна авария, би позволило бързо и с достатъчна точност да се оценят дозите на пострадалите лица.

За да верифицираме зависимостта доза-ефект, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване, ние я приложихме за оценка на дозата в междудеятелно упражнение, което бе проведено в рамките на проекта RENEВ, чиято цел е изграждане на европейска мрежа от биодозиметрични лаборатории. Нашата задача бе да изчислим дозите на три проби с код А, В и С и въз основа на оценените дози да определим в коя сортировъчна категория попада всяка една от тях. Категориите бяха следните: (1) ниска доза под 1Gy; (2) средна доза в диапазона 1-2Gy и (3) висока доза над 2Gy. За изпълнението на поставената задача бе извършено имунофлуоресцентно оцветяване на γ -H2AX/53BP1 фокуси за визуализиране местата на двойноверижните разкъсвания в молекулата на ДНК. Анализиранията честота на γ -фокуси бе използвана за изчисляване на дозите, с които бяха облъчени пробите А, В и С. За тази цел бе приложена зависимост доза-ефект, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване с γ -лъчи (Таблица 4).

Таблица 4. Оценка дозата на проби, облъчени с неизвестни дози, за верифициране на зависимост доза-ефект, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване с γ -лъчи.

Код на пробата	Брой клетки	Брой фокуси	Честота на фокусите \pm SE	Оценена доза (Gy)	95% CI (Gy)	Реална доза (Gy)
A	80	451	5,64 \pm 0,27	1,29	1,16 - 1,42	1,8
B	100	21	0,21 \pm 0,05	-0,02	-0,04 - 0,01	0
C	100	113	1,13 \pm 0,11	0,2	0,15 - 0,26	0,4

Оценените от нас дози, за всяка проба, бяха по-ниски от реалните физични дози. Причина за това, вероятно е репарацията на ДНК, която е настъпила по време на транспортиране на пробите, което от своя страна е довело до понижаване в честотата на γ -фокуси. Доставка на лимфоцитните суспензии е продължило около 44 часа, като през това време температурата в пакета се е повишила и при пристигането си в НЦРПЗ, температурния регистратор отчиташе 8°C. Въпреки протеклата частична репарация в ДНК, значителна част от γ -фокусите бе запазена и ние успяхме да разграничим необлъчената от облъчените проби, а всяка от облъчените проби да разпределим в правилната сортировъчна група, към която принадлежи.

При използване на γ -фокуси за оценка на дозата, след аварийно облъчване, е необходимо максимално да се съкрати периода между вземане на кръвните проби и обработката им. Успоредно с това трябва да се инхибира и процеса на репарация в ДНК, който протича по време на транспортиране на пробите. Експериментално е установено, че съхраняването на пробите за анализ при температура 0°C, след облъчване с доза 0,5 Gy, запазва сигнала на γ -H2AX фокусите до 24 часа.

Чрез прилагане на изградената от нас зависимост доза-ефект, ние тествахме валидността ѝ и съответно потенциалната ѝ възможност за оценка на дозата в случай на реален радиационен инцидент. Получените резултати показаха, че повишената честота на γ -H2AX/53BP1 фокуси в лимфоцити от периферна кръв може да се използва като надежден биоиндикатор за радиационно въздействие. Методът е приложим при условия на мащабен радиационен инцидент, когато от изключително значение е да се направи бързо сортиране на пострадалите с цел идентифициране на сериозно облъчените лица от тези, получили пренебрежимо ниски дози. Микроскопският анализ на γ -фокуси притежава необходимата чувствителност и дава възможност да се направи една бърза първоначална оценка на дозата, на базата на която засегнатите лица да бъдат разпределени в три сортировъчни категории (ниска доза < 1Gy, средна доза 1–2 Gy и висока доза > 2 Gy). Прецизна оценка на дозата на пострадалите ще бъде следваща стъпка, която ще даде по-точна информация на медицинските екипи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата работа бе извършена биодозиметрия при пет лица, пострадали в радиационна авария в гр. Стамболийски през 2011г. За биологична оценка на получените дози бяха приложени два цитогенетични метода – конвенционален анализ на нестабилни хромозомни аберации и цитокинезис-блок микронуклеус тест. Радиационно индуцираната честота на дицентрици+пръстени, както и на микронуклеуси в периферни лимфоцити на всяко едно от засегнатите лица, бе използвана за изчисляване на погълнатите дози. Резултатите от извършената биодозиметрия показаха, че индивидуалните дози, получени в резултат на радиационната авария са над 1Gy. Стойностите на дозите, оценени по двата метода, са съпоставими, което показва, че микронуклеус тестът и цитогенетичният анализ на дицентрици и пръстени, са надеждни методи за биодозиметрия след аварийно облъчване с йонизиращо лъчение.

Дозите на облъчените лица бяха изчислени трикратно, след анализ на различен брой лимфоцити, за да установим как броя на отчетените клетки влияе върху точността на оценената доза, както и върху диапазона на доверителния интервал. Получените резултати, при всяко едно от лицата, показаха разлика между трите изчислени дози в рамките на 0,5Gy, което се допуска, когато се прави първоначална оценка на получената доза. Настоящото проучване потвърждава, че броя на анализиранияте клетки оказва голямо влияние върху границите на 95% доверителен интервал. Ние установихме, че с увеличаване на броя отчетени лимфоцити, намалява диапазона между горната и долната граница на този интервал, както е описано в литературата.

При цитогенетичния анализ, извършен 40 часа след аварията, бе отчетено разпределението на дицентрици и пръстени, както и на микронуклеуси сред изброените лимфоцити на облъчените лица. Резултатите показаха, че колкото по-висока е получената доза, толкова по-голям е дялът, както на лимфоцитите с повече от един дицентрици или пръстен, така и на лимфоцитите с повече от един микронуклеус.

При първия медицински преглед бяха регистрирани продромалните признаци и симптоми на пострадалите лица и бяха взети проби за пълна кръвна картина с диференциално броена на левкоцити (Djounova et al., 2012).

Анализът на цитогенетичните резултати, както и данните от хематологичните изследвания показаха, че оценката на погълнатите дози,

направена въз основа на продромалните признаци и симптоми, е подценила тежестта на радиационното въздействие.

Методът за анализ на дицентрици и пръстени бе приложен при част от пострадалите лица, с цел проследяване изменението в честотата на радиационно индуцираните нестабилни хромозомни аберации във времето след облъчване. Изследван е периода от първото вземане на кръвни проби за биологична оценка на дозата (40 часа след аварията през 2011г.) до месец октомври 2015г.

Проследяването на нестабилните аберации при **Пациент 1**, **Пациент 2** и **Пациент 3**, показва наличието на две фази в промяната на честотата им – период на бързо и период на бавно понижение. При **Пациент 1** (5,6 Gy) бе наблюдавано най-съществено редуциране, като в рамките на първата година след аварията, честотата на дицентрици и пръстени бе понижена с 59%. През първата година след радиационната авария, при **Пациент 2** (3,37 Gy) и **Пациент 3** (2,47 Gy), също бе наблюдаван начален период на по-съществено редуциране в честотата на дицентрици и пръстени, но по-слабо изразено в сравнение с **Пациент 1**. Една година след радиационната авария все още бе наблюдавана дозова зависимост в сумарната честота на радиационно индуцираните дицентрици и пръстени, при пострадалите лица. През следващите три години, понижението в честотата на дицентрици и пръстени при тези лица продължава, но значително по-бавно, в сравнение с понижението, което бе наблюдавано през първата година след аварията. Независимо от редуцирането на радиационно индуцираните хромозомни аберации, четири години след аварията, честотата им все още е значително по-висока от спонтанната честота за българската популация.

Изясняването на проблема, засягащ персистирането на нестабилни хромозомни аберации в периферна кръв е от изключителна важност, особено в случаите, когато има забавяне при вземането на кръвни проби за биодозиметрия, напр. повече от няколко седмици. Резултатите, описани в настоящата работа, обясняват отчасти несъответствията сред авторите относно времето, за което първоначалната честота на нестабилните хромозомни аберации намалява наполовина. Вероятно най-голямо значение за продължителността му има дозата, получена по време на облъчване.

През последното десетилетие, белтъкът γ -H2AX и p53-свързващия протеин (53BP1) се утвърдиха като биомаркери за детектиране на радиационно индуцирани увреждания в ДНК. Създаването на флуоресцентни антитела, специфични за γ -H2AX и 53BP1, позволи да се разработи чувствителен метод, с който микроскопски да се визуализират и количествено да се определят местата на двойноверижни разкъсвания, след радиационно въздействие.

Количеството на γ -H2AX/53BP1 фокуси намалява с времето след облъчване, което отразява кинетиката на репаративните процеси. Понижението в честотата на γ -фокуси е лимитиращ фактор, който частично може да бъде избегнат чрез изграждане на зависимост доза-ефект, за оценка на дозата, на различни часови интервали. В настоящата работа, ние избрахме да изградим две зависимости доза-ефект – на 4-тия час след *in vitro* облъчване (определя се като най-ранния час, в който може да се вземе кръв при радиационен инцидент) и на 24-тия час след *in vitro* облъчване (определя се като оптимален час, в който може да се вземе кръв при радиационен инцидент).

Честотата на γ -фокуси, анализирана на 4-тия и 24-тия час след *in vitro* облъчване, нараства линейно с дозата йонизиращо лъчение до 3 Gy. Съпоставянето на получените резултати показва, че количеството γ -H2AX/53BP1 фокуси, което остава на 24-тия час след *in vitro* облъчване в дозовия диапазон 1-3 Gy γ -лъчи, се е редуцирало приблизително 3 пъти, в сравнение с честотата, анализирана на 4-тия час. Това понижение отразява ефекта на времето, изминало след облъчване, върху честотата на γ -фокуси, която се редуцира поради протичаща репарация на двойноверижните разкъсвания в ДНК. Въпреки наблюдаваното понижение в честотата на γ -H2AX/53BP1, след 24-часов инкубационен период, значителна част от γ -фокусите бяха запазени и все още се наблюдаваше дозова зависимост в честотата им.

За да верифицираме зависимостта доза-ефект, изградена на 4-тия час след *in vitro* облъчване, ние я приложихме в междулабораторно упражнение, което бе проведено в рамките на проекта RENEВ, чиято цел е изграждане на европейска мрежа от биодозиметрични лаборатории. Чрез прилагане на изградената от нас зависимост доза-ефект, ние тествахме валидността ѝ и съответно потенциалната ѝ възможност за оценка на дозата в случай на реален радиационен инцидент. Получените резултати показаха, че повишената честота на γ -H2AX/53BP1 фокуси в лимфоцити от периферна кръв може да се използва като надежден биоиндикатор за радиационно въздействие. Методът е приложим, при възникване на машабен радиационен инцидент, за бързо сортиране на пострадалите и идентифициране на сериозно облъчените лица от тези, получили пренебрежимо ниски дози. Микроскопският анализ на γ -фокуси притежава необходимата чувствителност и дава възможност да се направи една бърза първоначална оценка на дозата, на базата на която засегнатите лица да бъдат разпределени в три сортировъчни категории (ниска доза < 1Gy, средна доза 1–2 Gy и висока доза > 2 Gy). Прецизна оценка на дозата на пострадалите ще бъде следваща стъпка, която ще даде по-точна информация на медицинските екипи.

ИЗВОДИ

1. Проведената биологична оценка на погълната доза при пет лица, пострадали при радиационна авария в гр. Стамболийски, чрез конвенционален хромозомен анализ на дицентрици и пръстени показва, че лицата са получили дози над 1 Gy.
2. Наблюдавано бе повишение в честотата, както на дицентрици и пръстени, така и на микронуклеуси, при пострадалите в радиационната авария.
3. Дозите, изчислени чрез анализ на нестабилни хромозомни аберации и микронуклеуси, при засегнатите лица са съпоставими, което гарантира надеждността на получените резултати.
4. Биодозиметрията, извършена в настоящата работа при реален случай на аварийно облъчване, показва, че анализът на 50 лимфоцита е достатъчен, за да се направи една първоначална прогнозна оценка на дозата, при лица получили над 1 Gy.
5. Наблюдавана бе дозова зависимост в процентното съдържание, както на клетки с повече от един дицентрик или пръстен, така и на клетките с повече от един микронуклеус.
6. Проследяването на нестабилните хромозомни аберации при Пациент 1, Пациент 2 и Пациент 3 за период от 4 години, показва наличието на две фази в промяната на честотата им – период на бързо и период на бавно понижение.
7. Най-съществено редуциране в честотата на дицентрици и пръстени бе наблюдавано при Пациент 1, получил най-висока доза.
8. Честотата на нестабилни хромозомни аберации, при изследваните лица, бе значително по-висока от спонтанната честота за българската популация, четири години след радиационната авария.
9. Цитогенетичните и хематологичните показатели дават по-точна оценка на погълнатата доза, в сравнение със симптомите, характеризиращи т. нар. продромална фаза на острия радиационен синдром.
10. Анализът на радиационно индуцирани γ -H2AX/53BP1 фокуси е много подходящ за първоначална бърза оценка на дозата, на базата на която да се сортират засегнатите лица.

ПРИНОСИ

А. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ:

1. За първи път в България е извършена биологична дозиметрия при сериозно пострадали лица, получили дози над 1 Gy.
2. Оценката на индивидуалните дози е извършена чрез прилагане на два цитогенетични метода.
3. Потвърдена е хипотезата, че анализът на 50 лимфоцита е достатъчен за оценка на дозата, при лица облъчени с дози над 1 Gy.
4. За първи път е проследено изменението в честотата на нестабилни хромозомни аберации за период от четири години при лица, пострадали в радиационна авария в България.
5. Изградени са две зависимости доза-ефект за нарастване честотата на γ -H2AX/53BP1 фокуси в зависимост от дозата γ -лъчи (на 4-ти и 24-ти час след облъчване), приложими за трияж при масови радиационни инциденти и аварии.

Б. МЕТОДИЧНИ:

6. Въведен и оптимизиран е нов метод за биодозиметрия, чрез анализ честота на радиационно индуцирани γ -H2AX/53BP1 фокуси.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. Grégoire E, Hadjidekova V, Hristova R, Gruel G, Roch-Lefevre S, Voisin P, **Stavnova A**, et al. Biological dosimetry assessments of a serious radiation accident in Bulgaria in 2011. Radiat Prot Dosimetry. 2013; 155(4): 418-422.
2. **Albena Stavnova**, Ljubomira Popova, Polina Kutsalo, et al. Dose-response curves for the induction of γ -H2AX/53BP1 foci after in vitro irradiation with γ -rays. Radiat Prot J. 2016; 6: 17-20.
3. Moquet Jayne; Barnard Stephen; **Stavnova Albena**; et al. The second gamma-H2AX assay inter-comparison exercise carried out in the framework of the European biodosimetry network (RENEB). Int J Radiat Biol. 2017; 93: 58-64.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Hadjidekova V, Hristova R, Atanasova P, Popova L, **Stavnova A**, Deleva S. Biological dosimetry in radiation accidents. Dose-response curves by dicentric analysis and micronucleus test. BioDose 2008, International Conference. September 7-10, 2008, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire, USA.

A. Stavnova, V. Hadjidekova, R. Hristova, L. Popova, D. Georgieva. Three-year follow-up study on chromosomal aberrations in three victims accidentally exposed to several Gy of Co-60 γ -rays. DoReMi training course on data interpretation and uncertainty analysis for the combined low dose radiation research disciplines. September 1-5, 2014, St Ann's college, Oxford, UK.

V. Hadjidekova, Hristova R, **Stavnova A**, Deleva S, Ainsbury E, Wojcik A, Roy L, Oestreicher U, Kulka U. Biological dosimetry based on dicentric analysis of different number scored cells. EPRBioDose2015, International Conference. October 4-8, 2015, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, USA.

Biological dosimetry assessment of a serious radiation accident in Bulgaria. Gamma-H2AX assay for biodosimetry in the event of a large-scale radiation emergency

PhD Thesis, Sofia, 2021

Summary

Biodosimetry is the measurement of radiation induced changes in the human body to assess acute- and long-term health risks. When physical dosimetry is unavailable, cytogenetic analysis is often the only available dose estimation method.

In the present study, dicentric analysis and micronucleus assay were performed to estimate the absorbed radiation dose for five subjects, accidentally exposed to acute high-dose and whole-body external irradiation. The results of performed biodosimetry showed that individual doses exceeded 1Gy. The doses estimated by these methods were in a good agreement. We examined the dynamics of dicentrics plus rings (dic+r) frequency over time in this real case of accidental exposure. The follow-up study extending over four years revealed a reduction in the frequencies of dic+r in lymphocytes from three of the victims, exposed to ^{60}Co source. The kinetic attenuating frequency of unstable chromosomal aberrations with the time seems to depend on the dose received by the individual.

The γ -H2AX assay can be used for rapid triage in an emergency situation, as it is sensitive and because of the speed and ease of the method. In the present thesis we have studied different time points for γ -H2AX/53BP1 detection, using immunofluorescence microscopy and assessed the disappearance of the foci after irradiation. We also established dose-response calibration curves after *in vitro* γ -irradiation of peripheral blood lymphocytes, at 4 h and 24 h post-exposure. The frequency of γ -foci increased linearly with the dose for the analysed post-irradiation incubation times. The data obtained, showed that the yields of nuclear foci decreased during the incubation period of 24 h, due to the repair of DNA DSBs, but still followed dose-effect linearity. Three blind irradiated samples were performed to verify the dose-response equation, generating at 4 h post-exposure.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своите най-сърдечни благодарности на моя научен ръководител доц. Росица Христова за напътствията и помощта по време на разработването на дисертационният труд.

Благодаря на проф. д-р В. Хаджидекова, която ме въведе в областта на радиобиологията и от чийто опит научих много по време на своето професионално развитие.

Благодаря на гл. ас. Любомира Попова-Хаджийска за съветите и помощта, която ми оказа при статистическата обработка на данните.

Изключително съм благодарна на настоящите и бившите колеги от отдел „Радиобиология“, които компетентно и с желание участваха в изработването на голяма част от работата в този дисертационен труд.

Благодаря на лаборатория Дозиметриче контрол (SSDL) към НЦРПЗ за съдействието при изработването на този труд.

Сърдечно благодаря на семейството си и на моите родители, които винаги са ме разбирали, подкрепяли и окуражавали в трудни за мен моменти.

НЦРРЗ
София, 2021г.