

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.112>

УДК 616.14:576.5:614.875

Э.А. Дёмина

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии

им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

E-mail: edjomina@ukr.net

Оценка влияния профессионального облучения на цитогенетические показатели лимфоцитов периферической крови

Представлено академиком НАН Украины В.Ф. Чехуном

Выполнено цитогенетическое обследование радиологов с различным стажем работы в сфере действия ионизирующего излучения. Предварительные данные указывают на то, что у радиологов со стажем работы свыше 1,5 года примерно в 70 % случаев регистрируется повышенный уровень хромосомных aberrаций, в том числе дицентрики и транслокации (от 0,5 до 6,0 / 100 метафаз). Это свидетельствует о лучевой нагрузке на геном обследованных профессионалов. Радиомитигаторы инозин и тималин снижают частоту радиационно-индуцированных aberrаций хромосом при облучении в малых дозах до значений среднепопуляционного спонтанного уровня.

Ключевые слова: профессиональное облучение, лимфоциты крови, нестабильность генома, канцерогенный риск, радиомитигаторы.

В настоящее время отмечается быстрый рост количества медицинских радиологических процедур, являющихся основным источником воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на человека. Рассчитано, что за жизнь одного поколения в США средняя эффективная доза медицинского облучения увеличилась и уже в 2006 г. составила 3,0 мЗв. Эта величина сопоставима с эффективной дозой, которую ежегодно получает человек от естественного фона ИИ [1]. Благодаря техническим достижениям в области медицинской радиологии количество проводимых процедур, в том числе компьютерной томографии (КТ), в мире постоянно возрастает и потому их вклад в общую среднюю дозу облучения также увеличивается [2]. Так, по данным Организации экономического сотрудничества и развития в США в 2011 г. число процедур КТ на 1000 чел. составило 273,8 сканирований в год [3]. Следует отметить, что благодаря внедрению в практику цифровых технологий рентгенодиагностики дозовая нагрузка на персонал за последние десятилетия имеет выраженную тенденцию к снижению [2, 4]. Тем не менее разработке способов оценки радиационных рисков у лиц, занятых в

© Э.А. Дёмин, 2018

сфере действия ИИ, уделяется все большее внимание [5, 6]. В настоящее время рассматривается проблема оптимизации радиационной защиты в ситуациях одновременного профессионального и медицинского (например, с диагностической целью) облучения [2]. Идентификация маркеров профессионального сочетанного облучения с использованием цитогенетического FISH-метода позволила выявить у профессионалов сложные хромосомные перестройки, в том числе внутривитомосомные, в клетках костного мозга [7]. Являясь индикаторами лучевого воздействия, структурные перестройки хромосом наряду с точковыми мутациями могут участвовать в злокачественном перерождении клеток [8, 9]. В этом качестве выступают в основном те абберации хромосомного типа, которые механически не препятствуют процессу митоза и переходят в дочерние структуры, сохраняясь в потомстве первоначально облученных клеток. Роль хромосомной перестройки будет зависеть от ее конкретного расположения и вследствие дисбаланса хромосомного набора может приводить абберантную клетку к гибели либо индуцировать образование злокачественного клона, а возможно, и оставаться нейтральной для дальнейшей ее судьбы.

В ряде исследований показана возможность прогноза канцерогенного риска по частоте аббераций хромосом в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) [10, 11]. Разработанная тест-система культуры ЛПК человека с последующим цитогенетическим анализом рекомендована ВОЗ, МАГАТЭ, НКДАР ООН для проведения радиационно-цитогенетических исследований, в том числе биоиндикации лучевых повреждений. Кроме того, хромосомные абберации ЛПК являются моделью соматических клеток человека для изучения механизмов развития и ранней диагностики злокачественных новообразований. Использование этого уникального объекта для проведения радиационно-цитогенетических исследований обусловлено многими предпосылками, основные из которых следующие: исследуются хромосомы главных функциональных клеток иммунной системы (Т-лимфоциты); высокая концентрация клеточной популяции, так как в 1 мл крови содержится $(1-3) \cdot 10^6$ малых лимфоцитов, способных к бласттрансформации при культивировании; высокая радиочувствительность хромосом лимфоцитов по сравнению с хромосомами других клеток позволяет регистрировать достоверное повышение индуцированного уровня аббераций хромосом над спонтанным. Высокая мобильность лимфоцитов в кровяном русле, распределение лимфатических узлов по всему организму, способность лимфоцитов аккумулировать абберации хромосом позволяют судить о радиочувствительности организма в целом. Существует фракция долгоживущих лимфоцитов, а также стволовых клеток, впервые вступающих в деление спустя значительное время после облучения и сохраняющих, таким образом, индуцированные хромосомные повреждения даже нестабильного типа на протяжении десятков лет.

В.Ю. Нугис и М.Г. Козлова провели углубленный анализ данных литературы, в том числе европейских исследователей, в связи с проблемой объективного прогноза возникновения злокачественных заболеваний [12]. Исследователи пришли к выводу, что корреляция развития онкогенеза с числом хромосомных аббераций в культуре ЛПК обнаруживается еще за несколько лет до развития болезни. Однако зачастую цитогенетический анализ выполняется у заведомо больных людей с измененным внутренним статусом, когда диагноз уже верифицирован [13]. Радиационно-индуцированная хромосомная нестабильность облучаемых клеток может предопределить в будущем их онкогенную трансформацию, т. е. развитие радиогенного рака [5]. Поэтому актуальным и важным в теоретическом и прак-

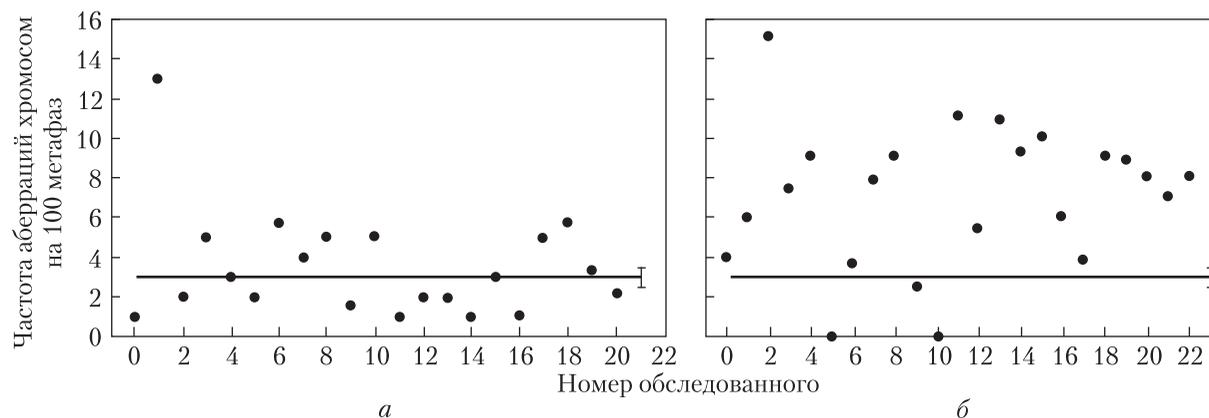


Рис. 1. Частота aberrаций хромосом в лимфоцитах крови радиологов со стажем работы не более 1,5 года (а) и свыше 1,5 года (б)

тическом плане являются цитогенетические исследования, направленные на изучение нестабильности генома лиц, чья профессиональная деятельность связана с использованием источников ИИ.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение частоты и спектра aberrаций хромосом в лимфоцитах крови радиологов.

Материалы и методы. Исследование выполнено с использованием тест-системы культуры ЛПК 43 радиологов. В работе руководствовались положением Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2008), которая предусматривает информированное согласие доноров на участие в исследовании. Культивирование ЛПК осуществляли полумикрометодом в соответствии со стандартным протоколом [14]. Культуральная смесь включала 0,5 мл цельной гепаринизированной венозной крови, 4,5 мл питательной среды RPMI 1640 (“Biowest”, Франция); 0,5 мл эмбриональной телячьей сыворотки (“PPA”, Австрия), 10 мкл гентамицина (“Здоровье”, Украина) и 0,1 мл митогена Т-лимфоцитов — фитогемагглютинаина (форма М “Gibco-Invitrogen”, США) для стимуляции Т-лимфоцитов. Флаконы с культурой ЛПК содержали в термостате при 37,0 °С в течение 52 ч, что позволило анализировать клетки в первом митозе. Последние 3 ч клетки культивировали с колленидом (“Biowest”, Франция) в концентрации 0,5 мкг/мл культуральной среды. После окончания инкубации клеток проводили их гипотоническую обработку приготовленным *ex tempore* 0,075 М раствором KCl в течение 10 мин при 37 °С. Далее клеточную суспензию несколько раз обрабатывали охлажденным фиксатором, приготовленным *ex tempore* из этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Для цитогенетического анализа препараты окрашивали 2 % раствором красителя Гимза (“Gibco”, США) в течение 10 мин.

Метафазный анализ полученных препаратов хромосом проводили соответственно с общепринятыми международными требованиями. Учитывали все типы aberrаций хромосом, распознаваемых с элементами частичного кариотипирования. Из aberrаций хромосомного типа учитывали ацентрические фрагменты (парные и точковые), центрические кольца и дицентрические хромосомы. Метод метафазного анализа при равномерной окраске хромосом позволяет регистрировать определенную часть стабильных aberrаций — реципрокные транслокации (примерно 20 % их общего количества). Из aberrаций хроматидного типа

учитывали ацентрические фрагменты и обменные аберрации. На каждое наблюдение анализировали в среднем не менее 200 метафаз.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1, а приведены предварительные данные цитогенетического обследования представителей первой группы, которые планировали либо уже несколько месяцев (не более 1,5 года) работали радиологами. В 38 % случаев общая частота аберраций хромосом в ЛПК в 1,5–2 раза превышала средние популяционные показатели. При этом в спектре хромосомных перестроек преобладали аберрации хроматидного типа, в основном делеции, а в двух случаях наблюдали стабильные аберрации хромосомного типа – транслокации (аномальные хромосомы). Повышенный выход аберраций хроматидного типа указывает на нестабильность генома обследованных лиц. Можно полагать, что дополнительное профессиональное облучение будет усложнять нестабильность генома и, следовательно, повышать канцерогенный риск. Такое предположение подтверждается данными цитогенетического обследования радиологов со стажем работы в сфере действия радиации 1,5 года и выше (см. рис. 1, б).

В отличие от первой группы, при цитогенетическом обследовании представителей второй группы, работающих радиологами свыше 1,5 года, примерно в 70 % случаев регистрируется повышенный уровень хромосомных аберраций. У 25 % обследованных лиц в спектре радиационно-индуцированных генетических повреждений наблюдаются лучевые маркеры (дицентрические и аномальные хромосомы) от 0,5 до 6,0/100 метафаз (рис. 2, 3). Это свидетельствует о лучевой нагрузке на геном обследованных профессионалов.

Как отмечено выше, накопление хромосомных изменений в клетках и канцерогенная небезопасность облучения в надфоновых дозах диктуют необходимость разработки под-

Частота и спектр аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови при сочетанном действии *in vitro* ионизирующего излучения и радиомитигаторов

Доза, Гр	Цитогенетические показатели (на каждые 100 проанализированных метафаз)					
	Частота аберрантных метафаз, %	Общая частота аберраций хромосом	Аберрации хромосомного типа	Дицентрики	Аберрации хроматидного типа	Делеции
0,1 Гр	6,06 ± 0,3	6,06 ± 0,3	2,99	0,3	3,07	3,0
Ин+0,1 Гр	1,3 ± 0,1	1,66 ± 0,1	1,06	0,2	0,6	0,6
0,2 Гр	7,0 ± 1,1	7,06 ± 1,1	3,26	0,5	3,8	3,6
Ин+0,2 Гр	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,60	0,5	1,1	0,75
0,3 Гр	7,5 ± 0,9	7,76 ± 0,9	4,16	0,9	3,6	3,34
Ин+0,3 Гр	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,6	1,20	0,2	1,0	0,8
0,5 Гр	10,9 ± 1,2	11,3 ± 1,3	5,23	1,3	5,9	5,6
Ин+0,5 Гр	3,5 ± 1,0	4,5 ± 1,0	3,50	1,5	1,0	0,5
1,0 Гр	17,4 ± 1,5	18,6 ± 1,6	11,40	5,4	7,2	6,8
Ин+1,0 Гр	14,8 ± 1,1	15,5 ± 1,0	8,60	4,2	6,7	6,0
Т+0,2 Гр	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	2,0	—	1,0	1,0
Т+0,5 Гр	5,0 ± 1,1	5,0 ± 1,1	3,0	—	2,0	1,0
Т+1,0 Гр	10,0 ± 1,7	10,0 ± 1,7	6,0	—	4,0	4,0

Примечание. Ин – инозин 0,01 мг/мл крови; Т – тималин 0,002 мг/мл крови; $p \leq 0,05$.

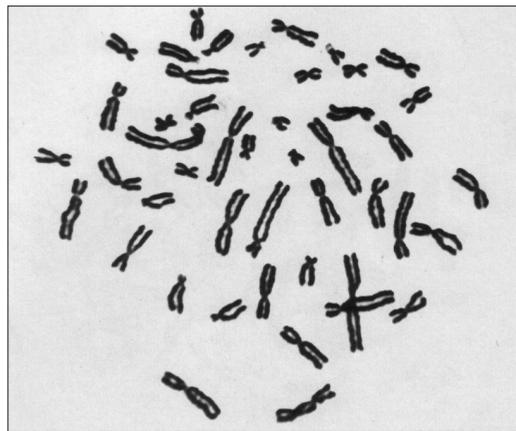


Рис. 2. Дицентрическая хромосома и сопровождающий парный фрагмент [5]

Рис. 3. Аномальная хромосома [5]

ходов для повышения радиорезистентности генома лиц, работающих в сфере действия ионизирующей радиации. К таким препаратам по праву можно отнести радиомитигатор нуклеозид пурина – инозин, а также препарат тимического происхождения – тималин (таблица).

Наибольший радиопротекторный эффект инозина и тималина наблюдается при облучении *in vitro* клеток крови радиологов в диапазоне малых доз – 0,1–0,2–0,3–0,5 Гр. Так, в условиях дополнительного действия инозина в терапевтической концентрации (0,01 мг/мл крови) частота радиационно-индуцированных перестроек хромосом снижается в 3,6; 2,7; 3,5; 3,0 раза соответственно, достигая, таким образом, среднепопуляционного спонтанного уровня генетических повреждений в радиочувствительных клетках человека. Кроме того, под влиянием радиомитигаторов уменьшается (либо полностью исчезают) количество лучевых маркеров.

Таким образом, предварительные результаты цитогенетического обследования радиологов указывают на существенное возрастание генетических изменений в иммунокомпетентных клетках – Т-лимфоцитах крови, ответственных за противоопухолевую защиту человека. Данные цитогенетического обследования профессионалов, занятых в сфере действия ИИ, будут полезны для последующей индивидуально обоснованной первичной профилактики возникновения радиационно-ассоциированных опухолей [5]. Некоторые исследователи считают, что данные цитогенетического обследования не всегда в полной мере информативны для включения конкретного лица, работающего в сфере действия ИИ, в группу повышенного канцерогенного риска [15]. Полезным в этом плане нам представляется изучение коррелятивных связей между уровнем хромосомных aberrаций и окислительным статусом ЛПК, поскольку концентрация активных форм кислорода (АФК) напрямую связана с радиочувствительностью этих клеток. Кроме того, АФК принимает активное участие в регуляции ряда биологических процессов, патогенезе ряда заболеваний. Известно, что у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС в отдаленные сроки содержание АФК в лимфоцитах крови существенно отличается от значений этого показателя у необлученных индивидуумов. Роль окислительного статуса в формировании хромосомной нестабиль-

ности клеток у лиц, чья профессиональная деятельность связана с использованием источников ИИ, будет изучена в наших дальнейших исследованиях.

Работа проведена в рамках Государственного заказа МОН Украины на НИР (договор ДЗ/27-2017) “Радіобіологічне обґрунтування первинної індивідуальної профілактики радіаційно-асоційованого раку” (№ 0117U006899, 2017–2018 гг.).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Schauer D.A., Linton O.W. National Council on Radiation Protection and Measurements report shows substantial medical exposure increase. *Radiology*. 2009. **253**, № 2. P. 293–296.
2. Кащеев В.В., Меняйло А.Н., Пряхин Е.А., Чекин С.Ю., Иванов В.К. Оценка и сравнение радиационных рисков медицинского и профессионального облучений. *Радиация и риск*. 2015. **24**, № 3. С. 5–14.
3. OECD Health Data: Health care resources: OECD Health Statistics (database). DOI: 10.1787/ct-exams-tot-table-2013-1-en.
4. Коваленко Ю.М. Роль цифрових технологій у зменшенні променевого навантаження на пацієнтів при проведенні рентгенологічних досліджень. *Укр. радіол. журн.* 2011. **19**, № 3. С. 340–341.
5. Дёмина Е.А. Радиогенный рак. Эпидемиология и первичная профилактика. Киев: Наук. думка, 2016. 196 с.
6. Иванов В.К., Меняйло А.М., Туманов К.А., Чекин С.Ю., Адамчик С.А., Михеенко С.Г. Мониторинг профессиональных радиационных рисков работников атомной промышленности (система АРМИР). *Радиация и риск*. 2016. **25**, № 1. С. 16–24.
7. Сотник М.В., Азазова Т.В. Идентификация маркеров профессионального сочетанного облучения молекулярно-цитогенетическим методом mFISH. *Радиация и риск*. 2016. **25**, № 3. С. 104–113.
8. Albertson D.G., Collins C., Cormick F., Gray J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. *J. Radiat. Prot.* 2011. **31**, № 1. P. 41–48.
9. Radford I.R. Chromosomal rearrangements as the basis for human tumourigenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 2004. **80**, № 8. P. 543–557.
10. Hagmar L., Stromberg U., Bonassi S. Impact of types of lymphocytes chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.* 2004. **64**, № 6. P. 2258–2263.
11. Domina E.A., Chekhun V.F. Experimental validation of prevention of the development of stochastic effects of low doses of ionizing radiation based on the analysis of human lymphocytes chromosome aberrations. *Exp. Oncol.* 2013. **35**, № 1. P. 65–68.
12. Нугис В.Ю., Козлова М.Г. Проблема связи частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови с риском развития заболеваний, в том числе после действия радиации. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017. **57**, № 1. С. 18–29.
13. Дёмина Э.А. Хромосомные аномалии в лимфоцитах крови первичных онкологических больных в постчернобыльском периоде. *ScienceRise: Biol. Sci.* 2016. № 1. С. 20–25.
14. Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 232 p.
15. Peter S., Portengen L., Bonassi S., Sram R., Vermeulen R. Intra- and inter individual variability in lymphocyte chromosomal aberrations: implications for cancer risk assessment. *Am. J. Epidemiol.* 2011. **174**, № 4. P. 490–493.

Поступило в редакцию 29.07.2018

REFERENCES

1. Schauer, D. A. & Linton, O. W. (2009). National Council on Radiation Protection and Measurements report shows substantial medical exposure increase. *Radiology*, 253, No. 2, pp. 293-296.
2. Kashcheev, V. V., Menyailo, A. N., Pryakhin, E. A., Chekin, S. Y. & Ivanov, V. K. (2015). Assessment and comparison of radiation risks of medical and professional exposures. *Radiation and Risk*, 24, No. 3, pp. 5-14 (in Russian).

3. OECD Health Data: Health care resources: OECD Health Statistics (database). doi: <https://doi.org/10.1787/ct-exams-tot-table-2013-1-en>
4. Kovalenko, Y. M. (2011). The role of digital technologies in decreasing the radiation load on the patients undergoing radiologic examinations. *Ukr. Radiol. Zhurn.*, 19, No. 3, pp. 340-341 (in Ukrainian).
5. Domina, E. A. (2016). Radiogenic cancer: Epidemiology and primary prevention. Kiev: Naukova Dumka (in Russian).
6. Ivanov, V. K., Menyailo, A. M., Tumanov, K. A., Chekin, S. Y., Adamchik, S. A. & Mikheenko, S. G. (2016). Monitoring of professional radiation risks of the workers in the nuclear industry (ARMIR system). *Radiatsiya i risk*, 25, No.1, pp. 16-24 (in Russian).
7. Sotnik, M. V. & Azazova, T. V. (2016). Identification of markers of professional combined radiation by molecular-cytogenetic method mFISH. *Radiatsiya i risk*, 25, No. 3, pp. 104-113 (in Russian).
8. Albertson, D. G., Collins, C., Cormick, F. & Gray, J. W. (2011). Chromosome aberrations in solid tumors. *J. Radiat. Prot.*, 31, No. 1, pp. 41-48.
9. Radford, I. R. (2004). Chromosomal rearrangements as the basis for human tumorigenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 80, No. 8, pp. 543-557.
10. Hagmar, L., Stromberg, U. & Bonassi, S. (2004). Impact of types of lymphocytes chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.*, 64, No. 6, pp. 2258-2263.
11. Domina, E. A. & Chekhun, V. F. (2013). Experimental validation of prevention of the development of stochastic effects of low doses of ionizing radiation based on the analysis of human lymphocytes chromosome aberrations. *Exp. Oncol.*, 35, No. 1, pp. 65-68.
12. Nugis, V. Y. & Kozlova, M. G. (2017). The problem of the correlation between the frequency of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes and the risk of developing diseases, including after the action of radiation. *Radiats. biologii. Radioecologii*, 57, No. 1, pp. 18-29 (in Russian).
13. Domina, E. A. (2016). Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of primary cancer patients in the post-Chernobyl period. *Science Rise: Biological Science*, No. 1, pp. 20-25 (in Russian).
14. Cytogenetic dosimetry: Applications in prepared-ness for and response to radiation emergencies (2011). Vienna: IAEA.
15. Peter, S., Portengen, L., Bonassi, S., Sram, R. & Vermeulen, R. (2011). Intra- and inter individual variability in lymphocyte chromosomal aberrations: implications for cancer risk assessment. *Am. J. Epidem.*, 174, No. 4, pp. 490-493.

Received 29.07.2018

Е.А. Дѣмина

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ
E-mail: edjomina@ukr.net

ОЦІНКА ВПЛИВУ ПРОФЕСІЙНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ

Виконано цитогенетичне обстеження радіологів із різним стажем роботи у сфері дії іонізуючого випромінювання. Попередні дані вказують на те, що у радіологів зі стажем роботи понад 1,5 року у приблизно 70 % випадків реєструється підвищений рівень хромосомних аберацій, у тому числі дицентриків і транслокацій (від 0,5 до 6,0/100 метафаз). Це свідчить про променеве навантаження на геном обстежених професіоналів. Радіомітгатори інозин та тималін знижують частоту радіаційно-індукованих аберацій хромосом при опроміненні в малих дозах до значень середньопопуляційного спонтанного рівня.

Ключові слова: професійне опромінення, лімфоцити крові, нестабільність геному, канцерогенний ризик, радіомітгатори.

E.A. Domina

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology
and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: edjomina@ukr.net

EVALUATION OF THE EFFECT OF PROFESSIONAL
IRRADIATION ON CYTOGENETIC PARAMETERS
OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

The cytogenetic examination of radiologists with different work experiences in the field of ionizing radiation has been performed. Preliminary data indicate that radiologists with over 1.5 years of experience exhibit, ~ in 70 % of cases, an increased level of chromosomal aberrations, including dicentrics and translocations (from 0.5 to 6.0 / 100 metaphases). This indicates a radiation load on the genome of the examined professionals. The radiomitigators inosine and thymalin reduce the frequency of radiation-induced aberrations of chromosomes upon the irradiation in small doses to the values of the average population spontaneous level.

Keywords: *professional exposure, blood lymphocytes, genome instability, carcinogenic risk, radiomitigators.*