

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНЫХ КРИВЫХ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ МЕДИЦИНСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России
(Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 4/2)

Актуальность. Учитывая активное внедрение ионизирующих излучений в различные сферы деятельности человека и возрастающую вероятность аварийных ситуаций с участием лучевого фактора, становится очевидной необходимость расширения технических возможностей биодозиметрических лабораторий по определению доз облучения при различных сценариях радиационных поражений. Важным аспектом готовности лаборатории к проведению исследований является разработка калибровочных кривых, необходимых для определения дозы облучения с помощью различных методов биологической дозиметрии, и внедрение этих разработок в практическую деятельность лаборатории.

Цель – разработка калибровочных кривых для определения биологической дозы облучения с использованием нескольких цитогенетических тестов – анализа дицентрических хромосом, микроядерного теста с цитохалазином Б и анализа преждевременно конденсированных хромосом.

Методология. Проведена оценка количественной зависимости частоты различных хромосомных нарушений, выявленных в лимфоцитах периферической крови человека, от внешней дозы облучения после гамма-облучения образцов крови *in vitro* в диапазоне доз 0–6 Гр. На основании этого получены уравнения дозовой зависимости частоты аберраций и калибровочные кривые, позволяющие определить биологическую дозу облучения.

Результаты и их анализ. В ходе анализа нескольких типов хромосомных нарушений, индуцированных ионизирующими излучениями *in vitro*: дицентрических хромосом, микроядер в бинуклеарных клетках и преждевременно конденсированных фрагментов хромосом, получены уравнения зависимости частоты исследуемых хромосомных аберраций от внешней дозы облучения. Проведена валидация полученных уравнений при определении дозы облучения образца крови *in vitro*, что подтвердило адекватность разработанных моделей. Определены контрольные значения исследуемых цитогенетических показателей. У пациентов, предполагающих наличие значительного облучения в процессе проведения медицинских исследований с применением ионизирующих излучений (компьютерная томография и пр.), с помощью полученной калибровочной кривой оценки поглощенной дозы установлены дозы облучения по количеству дицентрических хромосом.

Заключение. Разработанные уравнения дозовой зависимости нескольких цитогенетических показателей: дицентрических хромосом, микроядер в двуядерных клетках и преждевременно конденсированных хромосомных фрагментов позволяют достоверно оценить биологическую дозу облучения у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений. Применение батареи цитогенетических тестов расширяет возможности лаборатории в области биологической дозиметрии при различных сценариях облучения.

Ключевые слова: чрезвычайная ситуация, ионизирующее излучение, биодозиметрия, диагностическое облучение, кривая доза–эффект, микроядерный тест, дицентрическая хромосома, хромосомная аберрация, преждевременная конденсация хромосом.

Введение

Цитогенетическая дозиметрия нашла широкое применение при определении доз облучения у лиц, подвергшихся действию ионизирующих излучений вследствие профессиональных контактов с радиацией, аварийных ситуаций и катастроф, что имеет большое значение при сортировке и лечении пострадавших. Цитогенетическая биодозиметрия базируется на анализе различных типов нарушений хромосомного аппарата клеток

(нестабильные и стабильные хромосомные аберрации, микроядра, преждевременно конденсированные фрагменты, кольцевые хромосомы), количество которых зависит от дозы облучения. Наличие уравнений, описывающих зависимость количества аберраций от ее дозы, установленных при облучении клеток *in vitro*, позволяет проводить оценку поглощенной дозы ионизирующих излучений *in vivo*. Для выявления различных типов индуцированных нарушений разработаны

✉ Неронова Елизавета Геннадьевна – канд. биол. наук, зав. лаб. генетической диагностики и биодозиметрии, Всерос. центр экстрен. и радиац. медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (Россия, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 4/2), e-mail: neliner@yandex.ru

соответствующие методы исследований, которые имеют определенные преимущества и недостатки и рекомендованы к применению с учетом сценариев облучения, количества пострадавших, времени, прошедшего после радиационного воздействия до цитогенетического обследования [9].

Анализ нестабильных аберраций (дицентрических и других полицентрических хромосом, кольцевых хромосом) и стабильных аберраций (транслокаций) основан на исследовании хромосомных повреждений в лимфоцитах периферической крови, стимулированных к митотическому делению фитогемагглютинином после 48 ч культивирования *in vitro*. В течение этого времени происходит конденсация интерфазного хроматина до метафазных хромосом, что делает возможным визуализацию хромосомного набора клеток и обнаружение хромосомных нарушений. Анализ хромосомных аберраций позволяет оценить широкий диапазон доз для различных типов излучений при разных мощностях с высокой и низкой передачей энергии (LET, Linear energy transfer), сразу или в отдаленном периоде (до нескольких десятилетий) после облучения. Для ретроспективной оценки, даже спустя десятилетия, применяется анализ транслокаций, визуализация которых возможна благодаря использованию метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) [2, 15]. В ближайшее время после воздействия ионизирующих излучений для биологической дозиметрии используется анализ дицентрических хромосом [17], которые являются высокоспецифичными цитогенетическими маркерами радиационного воздействия. Данный метод в течение нескольких десятилетий является «золотым стандартом» биодозиметрии. Однако анализ дицентрических хромосомных аберраций имеет ряд недостатков, одним из которых может быть получение заниженного значения облучения в случаях больших воздействий (более 4 Гр) вследствие митотической гибели клеток и/или задержки митотического цикла, которые наблюдаются при дозах этого диапазона [11].

Для другого цитогенетического анализа – микроядерного теста с цитохалазином Б требуется культивирование клеток в течение 72 ч. Анализируются микроядра, которые образуются из фрагментов хромосом или целых хромосом и могут быть легко выявлены в интерфазной клетке. Однако микроядра могут быть индуцированы различными мута-

генными факторами эндогенной и экзогенной природы, не только ионизирующими излучениями, в связи с чем микроядерный тест не столь чувствительный и специфичный способ оценки воздействия радиации на организм человека, как анализ дицентриков. Этот тест достаточно легко выполним на практике, что позволяет рекомендовать его для обследования больших групп пострадавших при медицинской сортировке в ближайшее время после аварийного воздействия ионизирующих излучений [16].

Анализ преждевременно конденсированных хромосом, полученных методом слияния клеток (premature chromosome condensation, PCC), может быть выполнен сразу после облучения в течение 3–4 ч после постановки исследования. Поэтому он представляется наиболее подходящим анализом для оценки доз вскоре после облучения. Используя PCC-анализ, можно точно определить влияние низких доз (менее 1 Гр), а также высоких доз (более 4 Гр) после острого воздействия радиации с низкой и высокой LET [8]. Кроме того, было доказано, что PCC-анализ также обладает способностью точно различать общее или местное облучение [7]. Преимуществом данного исследования является возможность определить дозу облучения при очень высоких радиационных воздействиях, при которых биологическая дозиметрия с применением иных методов, основанных на анализе митотически активных клеток, затруднительна. Недостатком является быстрое снижение количества индуцированных нарушений, определяемых данным методом, что позволяет использовать этот подход только в течение ближайших 7 дней.

Таким образом, различные методы биологической цитогенетической дозиметрии имеют свои преимущества и недостатки. Наличие в арсенале лаборатории батареи тестов позволяет эффективно оценить дозу при различных сценариях облучения.

Одним из важных аспектов применения цитогенетических методов дозиметрии на практике является разработка калибровочных кривых – установление зависимости количества индуцированных хромосомных нарушений от дозы облучения. Учитывая различное техническое и материальное обеспечение лабораторий, а также опыт сотрудников, принимающих участие в анализе биомаркеров, по рекомендациям ВОЗ и МАГАТЭ каждой биодозиметрической лаборатории рекомендуется иметь собственные калибровочные кривые,

построенные в конкретных технических и материальных условиях и с учетом опыта сотрудников по выявлению и дифференцировке различных типов нарушений.

Цель – разработка калибровочных кривых для определения дозы облучения с помощью анализа дицентрических хромосом, микроядерного теста с цитохалазином Б (в бинуклеарных клетках) и анализа преждевременно-конденсированных хромосом, исследованных с применением метода слияния клеток, после гамма-облучения.

Материал и методы

Исследование, проведенное во Всероссийском центре экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (Санкт-Петербург), было одобрено этическим комитетом организации и выполнялось в рамках координационного исследовательского проекта CRP E35008 «Укрепление биологической дозиметрии в государствах-членах МАГАТЭ: совершенствование существующих методов и интенсификация сотрудничества и взаимодействия между различными институтами» (2012–2016 гг.) при его частичном финансировании МАГАТЭ.

Для определения контрольных значений исследуемых биомаркеров использовали образцы крови от 11 доноров (8 мужчин и 3 женщины в возрасте от 25 до 55 лет), для построения дозовых кривых – от 4 доноров (3 мужчин и 1 женщина в возрасте от 30 до 50 лет). Образцы крови получили путем венепункции (8 мл), забор которой проводили в вакуумные пробирки с гепарином натрия. От пациентов, принявших участие в обследовании, были получены добровольные информированные согласия.

Образцы крови подвергали воздействию γ -излучения на установке ИГУР-1 при комнатной температуре в дозах 0,25–6,0 Гр при мощности 1,2 Гр/мин. Через 24 ч после облучения лимфоциты использовали для проведения исследований.

Из образцов крови выделили лимфоциты с использованием фикола («Sigma») в соответствии с протоколом производителя: в центрифужную пробирку помещали 3 мл фикола, наслаивали кровь 3 мл и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре. На границе разделения фаз пастеровской пипеткой собирали лимфоциты, которые 3 раза промывали средой для культивирования RPMI-1640 (5 мл). Выделенные лимфоциты подсчитывали в камере Горяева и использовали для дальнейших исследований.

РСС-анализ хромосом. РСС-реакцию выполняли в соответствии с методикой ИАЕА [9]. Метод РСС основан на слиянии интерфазных G_0 -клеток с клетками, находящимися на стадии метафазы. В результате слияния факторы конденсации хроматина из метафазных клеток, попадая в интерфазные, индуцируют в них конденсацию хроматина. В случае биологической дозиметрии, как и в настоящем эксперименте, интерфазными клетками являлись облученные лимфоциты периферической крови человека. В качестве митотических использовали клетки яичника китайского хомячка (Hamster ovary cells, CHO), остановленные в процессе культивирования на стадии метафазы. Два типа клеток смешивали и в течение 1 ч проводили реакцию слияния в присутствии полиэтиленгликоля, который стимулировал образование клеточных гибридов. Подробно методика описана в публикации [13]. По окончании реакции клетки фиксировали и готовили препараты. Анализ полученных в эксперименте препаратов проводили под световым микроскопом при увеличении 1000 (рис. 1). В гибридных клетках визуализировали обычные метафазные хромосомы сирийского хомячка и 46 хромосом человека в виде хроматидных фрагментов, которые можно было легко подсчитать под микроскопом. При наличии индуцированных нарушений количество хроматидных фрагментов увеличивается.

Для каждого пациента анализировали 50 гибридных клеток и считали количество хроматидных элементов. В том случае, если количество превышало 46, их избыток учитывали как РСС-фрагменты.

Первые эксперименты по апробации методики РСС продемонстрировали, что количество гибридных клеток относительно невелико и составляет менее 3%, что требует больших трудозатрат по анализу необходимого количества клеток, достаточного для получения достоверного результата. Согласно литературным данным, индекс РСС (отношение количества клеток с преждевременно конденсированными хромосомами к общему количеству гибридных клеток, выраженное в процентах) может быть увеличен путем изменения соотношения интерфазных и митотических клеток [13], которые используются для постановки реакции. Было высказано предположение, что соотношение $1 \cdot 10^6$ клетки CHO / $5 \cdot 10^6$ лимфоциты является оптимальным для получения большого количества гибридных клеток. Наши экспе-

рименты выявили индекс РСС, составляющий 3,6% для этого соотношения. Другое соотношение (1:4) продемонстрировало более высокую частоту гибридных клеток – 4%. Однако самый высокий уровень метафаз РСС (9,7–10,3%) был выявлен при использовании клеток в соотношении 1:3 ($1 \cdot 10^6$ клеток СНО и $3 \cdot 10^6$ лимфоцитов), и это соотношение использовалось для следующих экспериментов.

Анализ дицентрических хромосом. $3 \cdot 10^6$ выделенных лимфоцитов добавляли к 5 мл среды RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка («БиолоТ») и 0,1 мл раствора фитогемагглютинаина («БиолоТ»), 20 мМ глутамин. Культуры инкубировали при 37 °С в течение 54 ч. За 8 ч до окончания культивирования добавляли раствор колхицина в конечной концентрации 0,2 мкг/мл. По окончании культивирования образцы центрифугировали, удаляли супернатант и добавляли предварительно нагретый (37 °С) гипотонический раствор (75 мМ KCl). После гипотонической обработки (30 мин) лимфоциты фиксировали (3:1, этанол 95% / ледяная уксусная кислота). Клетки промывали 3 раза в фиксаторе, а затем суспензию по каплям наносили на предметные стекла и окрашивали 4% раствором азура-эозина по Романовскому.

Препараты анализировали под микроскопом при увеличении 1000 (рис. 2). Учитывали клетки с радиационными маркерами (кольцевыми, дицентрическими и иными полицентрическими хромосомами), и считали количество их маркеров. Трицентрики, тетрацентрики и далее учитывали как 2, 3 дицентрика и далее в одной клетке. Для каждого пациента анализировали не менее 500 метафаз, за исключением высоких доз облучения, при которых наличие метафазных клеток было невысоким вследствие митотической гибели

облученных клеток или задержки митотического цикла, наблюдаемых при этих дозах облучения.

Микроядерный тест с цитохалазином Б. Выделенные лимфоциты ($3 \cdot 10^6$) добавляли к 5 мл среды RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка, 0,1 мл фитогемагглютинаина («БиолоТ») и 20 мМ глутамин. Культуры инкубировали при 37 °С в течение 68 ч. Через 24 ч после постановки культур клеток к среде добавляли цитохалазин-Б («ПанЭко») в концентрации 6 мкг/мл. По окончании культивирования образцы центрифугировали в течение 8 мин при 1000 об/мин, и супернатант удаляли. Клетки обрабатывали гипотоническим раствором (6 мл 75 мМ KCl при комнатной температуре) и центрифугировали в течение 8 мин при 1000 об/мин. Супернатант удаляли и добавляли фиксатор (3:1, этанол 95% / ледяная уксусная кислота). Смену фиксатора проводили 3 раза. Суспензию клеток раскапывали на предметные стекла и окрашивали 4% раствором азура-эозина по Романовскому. Анализировали только двуядерные клетки, подсчитывали количество микроядер в клетке (рис. 3). Для каждого пациента анализировали не менее 500 двуядерных клеток за исключением высоких доз, при которых наличие двуядерных клеток было невысоким вследствие митотической гибели клеток или задержки митотического цикла, наблюдаемых при этих дозах облучения.

При построении калибровочных кривых использовали методические подходы, предложенные в руководстве [9]. При статистическом анализе для всех типов хромосомных нарушений рассчитали частоту aberrаций и стандартную ошибку. Сравнение экспериментальной частоты нарушений и контрольных значений исследуемых aberrаций провели с применением точного критерия Фишера.

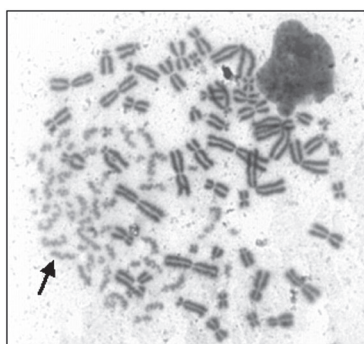


Рис. 1. Гибридная клетка с преждевременно конденсированными хроматидными элементами (стрелка).

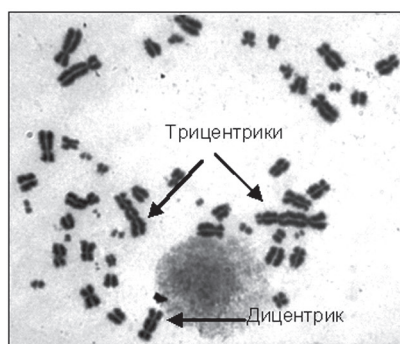


Рис. 2. Лимфоцит с наличием одной дицентрической и двух трицентрических хромосом.

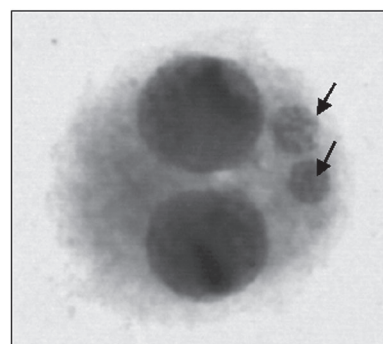


Рис. 3. Двуядерный лимфоцит с микроядрами (стрелки).

Для построения калибровочных кривых и расчета доз облучения у пациентов использовали программный продукт для цитогенетических биодозиметрических исследований Dose Estimate [4].

Результаты и их анализ

Современной биодозиметрической лаборатории рекомендуется иметь в арсенале панель различных цитогенетических методов, позволяющих определить дозу облучения при различных ситуациях: хроническом или аварийном воздействии радиации, у группы лиц или отдельных индивидуумов в случае массовых поражений населения радиационным фактором, в ближайший или отдаленный период времени после облучения, в случаях низких или высоких доз радиационного облучения. Считается необходимым, что каждая лаборатория должна разработать свою собственную калибровочную кривую для определения дозы облучения с целью минимизации межлабораторных различий, связанных с техническими навыками сотрудников лаборатории, выполняющих исследования, различиями в материально-технической оснащённости, что может сказываться на получаемых результатах. В настоящем исследовании выполнен анализ нескольких цитогенетических индикаторов радиационного воздействия (дицентрических, кольцевых хромосом, микроядер и РСС-фрагментов), построены калибровочные кривые для определения дозы облучения на основе этих индикаторов.

Построение калибровочных кривых выполнено с использованием программы Dose Estimate, в которую была внесена информация о количестве выявленных аберраций при тестируемых дозовых нагрузках, и рассчитаны корреляционные зависимости исследуемых показателей. Количество и частота выяв-

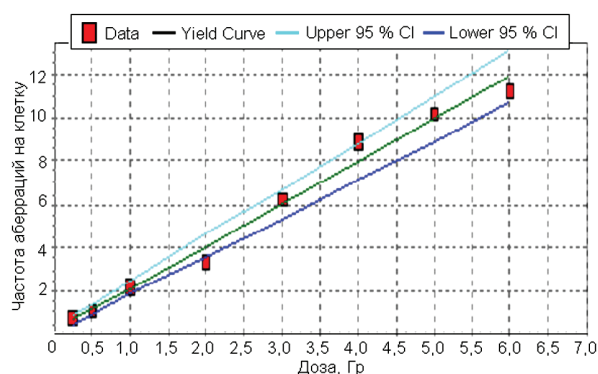


Рис. 4. Зависимость частоты преждевременно конденсированных фрагментов от дозы облучения.

Таблица 1

Частота РСС-фрагментов после γ -облучения

Доза облучения, Гр	Количество клеток	РСС-фрагменты	
		n	M $\pm$ m
0	1000	2	0,002 $\pm$ 0,001
0,25	100	79	0,79 $\pm$ 0,09
0,5	100	117	1,17 $\pm$ 0,11
1,0	100	223	2,23 $\pm$ 0,15
2,0	100	338	3,38 $\pm$ 0,18
3,0	100	619	6,19 $\pm$ 0,25
4,0	100	888	8,88 $\pm$ 0,30
5,0	100	1014	10,10 $\pm$ 0,32
6,0	100	1118	11,20 $\pm$ 0,33

Таблица 2

Частота дицентрических хромосом после γ -облучения

Доза облучения, Гр	Количество клеток	Дицентрические хромосомы	
		n	M $\pm$ m
0	1000	1	0,001 $\pm$ 0,001
0,25	1044	11	0,011 $\pm$ 0,003
0,5	1011	30	0,030 $\pm$ 0,005
1,0	1204	109	0,091 $\pm$ 0,009
2,0	1960	400	0,204 $\pm$ 0,032
3,0	1045	539	0,516 $\pm$ 0,022
4,0	1031	839	0,814 $\pm$ 0,028
5,0	1062	1504	1,420 $\pm$ 0,037
6,0	893	1503	1,680 $\pm$ 0,043

Таблица 3

Частота микроядер после γ -облучения

Доза облучения, Гр	Количество клеток	Микроядра	
		n	M $\pm$ m
0	1040	15	0,014 $\pm$ 0,004
0,25	1026	35	0,034 $\pm$ 0,006
0,5	2534	101	0,040 $\pm$ 0,004
3,0	2435	978	0,402 $\pm$ 0,013
4,0	2100	1376	0,655 $\pm$ 0,018
5,0	993	813	0,819 $\pm$ 0,029

ленных нарушений представлены в табл. 1–3. Для РСС-фрагментов зависимость доза–ответ была описана линейной моделью (рис. 4) и соответствовала уравнению:

$$Y = 0,0021 (\pm 0,0023) + 2,0200 (\pm 0,0788)D,$$

где Y – количество РСС-фрагментов на клетку; D – доза облучения (Гр).

Линейный характер зависимости количества выявленных нарушений от дозы облучения, установленный в этом исследовании, согласуется с результатами других авторов [8, 10].

Зависимость доза–ответ для частоты дицентрических хромосом (рис. 5) и микроядер (рис. 6) соответствовала линейно-квадратичной модели и описывалась уравнениями:

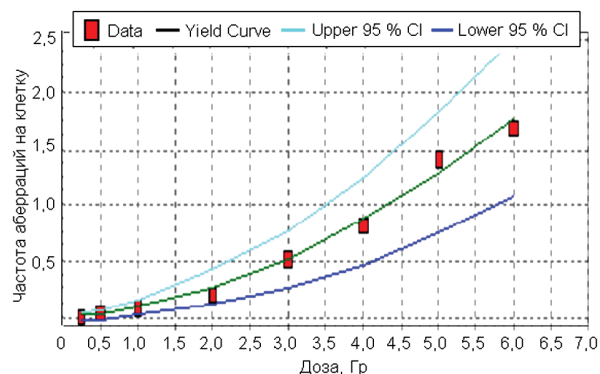


Рис. 5. Зависимость частоты дицентрических хромосом от дозы облучения.

- для дицентрических хромосом:

$$Y = 0,0011 (\pm 0,0026) + 0,0285 (\pm 0,0141)D + 0,0452 (\pm 0,0039)D^2,$$

где Y – частота радиационных маркеров (дицентрических и кольцевых хромосом) в пересчете на клетку; D – доза облучения (Гр);

- для микроядер:

$$Y = 0,0129 (\pm 0,0068) + 0,0565 (\pm 0,0213)D + 0,0239 (\pm 0,0054)D^2,$$

где Y – частота микроядер в пересчете на клетку; D – доза облучения (Гр).

Линейно-квадратичная зависимость частоты дицентрических хромосом и частоты микроядер от дозы облучения, полученная в этом исследовании, согласуется с результатами других исследований [1, 3, 5, 6, 12, 16].

Известно, что точность оценки в диапазоне низких доз зависит от фоновой частоты исследуемых показателей – дицентрических хромосом, микроядер и РСС-фрагментов. При определении дозовой нагрузки в первую очередь необходимо оценить значимость различий между спонтанными абберациями и индуцированной частотой нарушений. При превышении выявленных показателей над контрольными значениями становится возможным установление дозы облучения. Следовательно, лаборатория должна обладать информацией и о контрольных значениях цитогенетических маркеров, используемых для биологической дозиметрии. В связи с этим

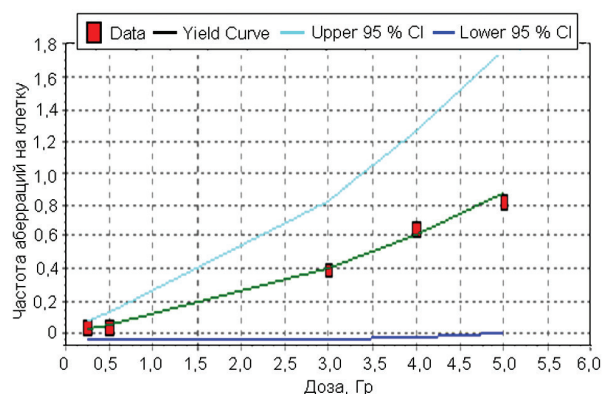


Рис. 6. Зависимость частоты микроядер от дозы облучения.

у 11 доноров был проведен анализ контрольных значений показателей, использованных в настоящем исследовании, и получены следующие значения: частота дицентрических хромосом (радиационных маркеров) составила $(0,09 \pm 0,034)\%$, частота РСС-фрагментов – $(1,27 \pm 0,30)\%$, количество микроядер – $(12,36 \pm 0,61)$ на 1000 бинуклеарных клеток.

Для валидации технологии на практике был проведен эксперимент, в рамках которого образец донорской крови был облучен в дозе 1 Гр. Для определения биологической дозы облучения были использованы три метода биологической дозиметрии – РСС, анализ дицентрических хромосом и микроядерный тест. Частота выявленных хромосомных нарушений установлена с применением методических подходов, описанных ранее, представлена в табл. 4.

Частота хромосомных аббераций превышала контрольные значения, что свидетельствовало о воздействии ионизирующих излучений и позволило с применением калибровочных кривых, разработанных в данном исследовании, определить биологическую дозу облучения. По результатам разных цитогенетических тестов показатели составили от $(1,09 \pm 0,19)$ до $(1,37 \pm 0,17)$ Гр, что соответствует внешнему облучению, которому был подвергнут исследуемый образец. Полученные результаты свидетельствуют об адекватной работе разработанных моделей.

Калибровочная кривая зависимости количества дицентрических хромосом от дозы

Таблица 4

Хромосомные нарушения, выявленные при облучении в дозе 1 Гр

Тест	Количество клеток	Хромосомные нарушения		Доза облучения, $(M \pm m)$ Гр
		n	$M \pm m$	
Анализ дицентриков	200	24	$0,12 \pm 0,020$	$1,13 \pm 0,22$
Микроядерный тест	500	54	$0,11 \pm 0,014$	$1,09 \pm 0,77$
РСС-фрагменты	50	110	$2,20 \pm 0,210$	$1,01 \pm 0,16$

облучения была применена на практике у пациентов, предполагающих наличие значительного радиационного воздействия в результате проведения медицинских исследований с применением ионизирующих излучений.

Пациент 1. После выполнения компьютерной томографии (КТ) у пациента появилась эритема в области лицевого отдела головы, в связи с чем возникло предположение, что это явилось следствием случайного переоблучения во время проведения томограммы. Пациент обратился в лабораторию спустя 1 нед после выполнения КТ-исследования. Для подтверждения (исключения) предположения о переоблучении была выполнена цитогенетическая оценка дозы облучения с применением анализа дицентрических хромосом. У пациента не были диагностированы онкологические заболевания, синдромы наследственной нестабильности хромосом, лучевая или химиотерапия не проводились, что могло повлиять на исследуемые цитогенетические показатели. Было проанализировано 1300 клеток и выявлено 2 цитогенетических радиационных маркера – две дицентрические хромосомы. Средняя доза общего облучения на все тело составила 15 мГр (нижняя и верхняя границы – 0 и 130 мГр). Таким образом, предположение, что пациент подвергся высокой дозе облучения, которая привела к индукции эритемы, может быть отклонено. Известно, что может встречаться повышенная чувствительность к воздействию радиации, когда даже малые, клинически незначимые дозы могут индуцировать ранние тканевые эффекты или повышенную чувствительность к контрастному препарату. В таких случаях био-

логическая дозиметрия помогает отклонить версию переоблучения.

Пациент 2. В лабораторию обратился пациент с целью проведения биологической дозиметрии, который был обеспокоен величиной дозы облучения, указанной в протоколах нескольких медицинских КТ-исследований, которые были выполнены в связи с диагностикой соматических заболеваний. В течение 2,5 лет проведено 5 исследований – последнее за 1 мес до обращения в лабораторию. У пациента не диагностированы онкологические заболевания, синдромы наследственной нестабильности хромосом. Лучевая или химиотерапия не проводились. Биологическая дозиметрия выполнена с применением анализа дицентрических хромосом. Проанализированы 500 метафаз и выявлены 10 дицентрических хромосом. Применение калибровочной кривой позволило рассчитать дозу внешнего облучения, которая находилась в диапазоне 221–627 мГр (в среднем – 440 мГр). Пациенту даны разъяснения и рекомендации.

Заключение

Таким образом, в результате выполнения настоящего исследования были построены калибровочные кривые, разработанные для нескольких методов биологической дозиметрии: анализа дицентрических хромосом, микроядерного теста и РСС-фрагментов. Разработка калибровочных кривых позволяет увеличить возможности лаборатории в области биологической дозиметрии ионизирующих излучений применительно к различным сценариям облучения.

Литература

1. Колюбаева С.Н. Хромосомные aberrации, микроядра и апоптоз в лимфоцитах при радиационных воздействиях и других патологических состояниях : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Обнинск, 2010. 32 с.
2. Неронова Е.Г., Саблина А.О., Алексанин С.С. Возможности реконструкции доз внешнего облучения у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции цитогенетическими методами // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2019. № 4. С. 70–78. DOI: 10.25016/2541-7487-2019-0-4-70-78.
3. Снигирева Г.П., Богомазова А.Н., Новицкая Н.Н. [и др.]. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов : мед. технология № ФС-2007/015-У. М., 2007. 29 с.
4. Ainsbury E.A., Lloyd D.C. Dose estimation software for radiation biodosimetry // Health Phys. 2010. Vol. 98, N 2. P. 290–295. DOI: 10.1097/01.HP.0000346305.84577.b4.
5. Beinke C., Braselmann H., Meineke V. Establishment of an x-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment // Health Phys. 2010. Vol. 98, N 2. P. 261–268. DOI: 10.1097/HP.0b013e3181b35a53.
6. Beinke C., Port M., Riecke A. [et al.]. Adaption of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay for improved triage biodosimetry // Radiation Research. 2016. Vol. 185, N 5. P. 461–472. DOI: 10.1667/RR14294.1.
7. Blakely W.F., Prasanna P.G.S., Kolanko C.J. [et al.]. Application of premature chromosome condensation assay in stimulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase finder // Stem Cells. 1995. Vol. 13, Suppl. 1. P. 223–230.

8. Chambrette V., Laval F., Voisin P. The utility of lymphocyte premature chromosome condensation analysis for biological dosimetry following accidental over exposure to ionizing radiation // Radiation Protection Dosimetry. 1999. Vol. 82. P. 125–131.
9. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies / International Atomic Energy Agency. Vienna, 2011. 229 p.
10. Darroudi F., Natarajan A.T., Bentvelzen P.A. [et al.]. Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays // Int. J. Radiat. Biol. 1998. Vol. 74, N 2. P. 207–215.
11. Hayata I., Kanda R., Minamihisamatsu M. [et al.]. Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura // J. Radiat. Res. 2001. Vol. 42, Suppl. S149–S155.
12. McNamee J.P., Flegal F.N., Greene H.B. [et al.]. Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool // Radiation Protection Dosimetry. 2009. Vol. 135, N 4. P. 232–242. DOI: 10.1093/rpd/ncp119.
13. Neronova E.G. Construction of calibration curve for premature chromosome condensation assay for dose assessment // Genome Integrity. 2016. Vol. 7, N 1. P. 1–4. DOI: 10.4103/2041-9414.197166.
14. Pantelias G.E., Maillie H.D. A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol // Somatic Cell. Genet. 1983. Vol. 5. P. 533–547. DOI: 10.1007/BF01574257.
15. Tawn E.J., Curwen G.B., Jonas P. [et al.]. Chromosome aberrations determined by FISH in radiation workers from the Sellafield Nuclear Facility // Radiation Research. 2015. Vol. 184, N 3. P. 296–303. DOI: 10.1667/RR14125.1.
16. Vral A., Fenech M., Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure // Mutagenesis. 2011. Vol. 26, N 1. P. 11–17. DOI: 10.1093/mutage/geq078.
17. Wilkins R., Romm H., Kao T.-C. [et al.]. Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events // Radiation Research. 2008. Vol. 169, N 5. P. 551–560.

Поступила 02.10.2021 г.

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

Для цитирования. Неронова Е.Г. Построение калибровочных кривых для биологической цитогенетической дозиметрии и опыт применения при медицинском облучении // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2021. № 4. С. 85–93. DOI 10.25016/2541-7487-2021-0-4-85-93

Calibration curves development for biological cytogenetic dosimetry and experience with medical exposure

Neronova E.G.

Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia
(4/2, Academica Lebedeva Str., St. Petersburg, 194044, Russia)

✉ Elizaveta Gennadievna Neronova – PhD. Biol. Sci., Head of the laboratory for genetical research and biodosimetry, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia (4/2, Academica Lebedeva Str., St. Petersburg, 194044, Russia), e-mail: nelineer@yandex.ru

Abstract

Relevance. Taking into account the increasing probability of exposure to ionizing radiation in humans (including emergencies, occupational and medical exposure), it became obvious that it is necessary to increase the technical capabilities of biodosimetric laboratories to estimate radiation doses for various exposure scenarios. Therefore, it is necessary to develop calibration curves for using different methods of biological dosimetry and to introduce these methodological approaches into the practical activities of the laboratory.

Intention. To develop calibration curves for determining the radiation dose using different cytogenetic methods: analysis of dicentric chromosomes, micronucleus test with cytochalasin B and the analysis of prematurely condensed chromosomal fragments (PCC) after gamma irradiation.

Methodology. Dependence of the frequency of chromosomal aberrations detected in peripheral blood lymphocytes from the external radiation dose after gamma *in vitro* irradiation of blood samples in the dose range of 0–6 Gy was evaluated. Equations of the dose dependence of the frequency of aberrations were obtained. Based on that calibration curves were created that let to determine the biological dose of radiation.

Results and Discussion. As a result of analysis of chromosomal aberrations induced *in vitro* by ionizing radiation (dicentric chromosomes, micronuclei in binuclear cells, and PCC fragments), dose-dependence equations have been obtained. The equations have been validated by determining the radiation dose of a blood sample irradiated *in vitro*, which confirmed the

adequacy of the developed models. Control levels of analyzed cytogenetic parameters were revealed. In patients suspected of being overexposed during medical research using ionizing radiation (CT studies), using the obtained calibration curve for assessing the absorbed radiation dose by the number of dicentric chromosomes, radiation doses indicating the absence of overexposure were established.

Conclusion. Developed equations for the dose dependence of the frequency of dicentric chromosomes, micronuclei in binucleated cells, and PCC fragments make it possible to efficiently estimate the biological dose of radiation in persons exposed to ionizing radiation. The use of a battery of cytogenetic tests expands the laboratory's capabilities in the field of biological dosimetry in various exposure scenarios.

Keywords: emergency, ionizing radiation, biodosimetry, diagnostic medical radiation, dose-effect calibration curves, dicentric analysis, micronucleus test, chromosome aberrations, premature chromosome condensation.

References

1. Kolyubaeva S.N. Hromosomnye aberratsii, mikroyadra i apoptoz v limfocitah pri radiatsionnykh vozdeystviyakh i drugih patologicheskikh sostoyaniyakh [Chromosomal aberrations, micronuclei and apoptosis in lymphocytes under radiation exposure and other pathological conditions]: Abstract dissertation Dr. Med. Sci. Obninsk. 32. p. (In Russ.)
2. Neronova E.G., Sablina A.O., Aleksanin S.S. Vozmozhnosti rekonstruktsii doz vneshnego oblucheniya u likvidatorov posledstviy avarii na Chernobyl'skoi atomnoi elektrostantsii tsitogeneticheskimi metodami [The ability of cytogenetic analysis to estimate radiation doses retrospectively in Chernobyl accident recovery workers]. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh* [Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations]. 2019. N 4. Pp. 70–78. DOI: 10.25016/2541-7487-2019-0-4-70-78. (In Russ.)
3. Snigireva G.P., Bogomazova A.N., Novitskaya N.N. [et al.]. Biologicheskaya indikatsiya radiatsionnogo vozdeystviya na organizm cheloveka s ispol'zovaniem tsitogeneticheskikh metodov : meditsinskaya tekhnologiya N FS-2007/015-U [Biological indication of radiation effects on the human body using cytogenetic methods: medical technology N FS-2007/015-U]. Moskva. 2007. 29 p. (In Russ.)
4. Ainsbury E.A., Lloyd D.C. Dose estimation software for radiation biodosimetry. *Health Phys.* 2010. Vol. 98, N 2. Pp. 290–295. DOI: 10.1097/01.HP.0000346305.84577.b4.
5. Beinke C., Braselmann H., Meineke V. Establishment of an X-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment. *Health Phys.* 2010. Vol. 98, N 2. Pp. 261–268. DOI: 10.1097/HP.0b013e3181b35a53.
6. Beinke C., Port M., Riecke A. [et al.]. Adaption of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay for improved triage biodosimetry. *Radiation Research.* 2016. Vol. 185, N 5. Pp. 461–472. DOI: 10.1667/RR14294.1.
7. Blakely W.F., Prasanna P.G.S., Kolanko C.J. [et al.]. Application of premature chromosome condensation assay in stimulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase finder. *Stem Cells.* 1995. Vol. 13, Suppl. 1. Pp. 223–230.
8. Chambrette V., Laval F., Voisin P. The utility of lymphocyte premature chromosome condensation analysis for biological dosimetry following accidental over exposure to ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry.* 1999. Vol. 82. Pp. 125–131.
9. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. International Atomic Energy Agency. Vienna. 2011. 229 p.
10. Darroudi F., Natarajan A.T., Bentvelzen P.A. [et al.]. Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. Vol. 74, N 2. Pp. 207–215.
11. Hayata I., Kanda R., Minamihisamatsu M. [et al.]. Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura. *J. Radiat. Res.* 2001. Vol. 42, Suppl: S149–S155.
12. McNamee J.P., Flegal F.N., Greene H.B. [et al.]. Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool. *Radiation Protection Dosimetry.* 2009. Vol. 135, N 4. Pp. 232–242. DOI: 10.1093/rpd/ncp119.
13. Neronova E.G. Construction of calibration curve for premature chromosome condensation assay for dose assessment. *Genome Integrity.* 2016. Vol. 7, N 1. Pp. 1–4. DOI: 10.4103/2041-9414.197166.
14. Pantelias GE, Maillie HD. A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell. Genet.* 1983. Vol. 5. Pp. 533–547. DOI: 10.1007/BF01574257.
15. Tawn E.J., Curwen G.B., Jonas P. [et al.]. Chromosome aberrations determined by FISH in radiation workers from the Sellafield Nuclear Facility. *Radiation Research.* 2015. Vol. 184, N 3. Pp. 296–303. DOI: 10.1667/RR14125.1.
16. Vral A., Fenech M., Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis.* 2011. Vol. 26, N 1. Pp. 11–17. DOI: 10.1093/mutage/geq078.
17. Wilkins R., Romm H., Kao T.-C. [et al.]. Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. *Radiation Research.* 2008. Vol. 169, N 5. Pp. 551–560.

Received 02.10.2021

For citing: Neronova E.G. Postroenie kalibrovannykh krivyykh dlya biologicheskoi tsitogeneticheskoi dozimetrii i opyt primeneniya pri meditsinskom obluchenii. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh.* 2021. N 4. Pp. 85–93. (In Russ.)

Neronova E.G. Calibration curves development for biological cytogenetic dosimetry and experience with medical exposure. *Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations.* 2021. N 4. Pp. 85–93. DOI 10.25016/2541-7487-2021-0-4-85-93