

ВЫДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА СРЕДИ ПРОФЕССИОНАЛОВ-АТОМЩИКОВ, СПЕЦИАЛИСТОВ ЯДЕРНОГО ЦЕНТРА

К. Ю. Иванов, В. И. Нагиба, кандидат биологич. наук, Е. А. Никанорова кандидат биологич. наук

ФГУП РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров

Введение

Международные стандарты определяют понятие радиационного риска как приращение числа возможных радиационно-индуцированных онкологических и соматических патологий, обусловленных величиной коллективной дозы [1].

Одним из наиболее распространенных методов индикация лучевого поражения и биологической дозиметрии является цитогенетический метод, при котором в качестве маркера облучения используются хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови [1,2]. Информация о «биологической» дозе, полученная с помощью цитогенетического метода, отражает результат радиационного воздействия с учетом индивидуальных особенностей организма, что позволяет прогнозировать ранние и отдаленные последствия облучения [3].

Известно, что хромосомным аберрациям принадлежит определяющая роль в злокачественной трансформации клеток. Между частотой хромосомных аберраций и риском канцерогенеза выявлена тесная взаимосвязь [4,5]. Не менее важным критерием развития онкопатологии является сниженный репарационный статус клеток организма [6].

К настоящему времени в ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» завершено комплексное молекулярно-генетическое обследование клеток крови двух когорт специалистов, которые в течение нескольких десятилетий проработали в условиях действия гамма-нейтронного излучения («гамма-нейтронная» когорты) или бета-излучения трития и его соединений («тритиевая» когорты) [7-10].

Результаты проведенного обследования послужили основанием для использования частоты хромосомных аберраций и эффективности репаративного синтеза ДНК при выделении среди профессионально облученных лиц групп риска, в которых можно прогнозировать увеличение числа онкологических и соматических патологий.

Материалы и методы исследования

Характеристика когорт обследования

Формирование когорт профессионалов проводили на основании анализа карт индивидуального дозиметрического контроля. Критериями включения обследованного в когорту профессионалов являлись: вид излучения, период работы в радиационно-опасных условиях труда, величина накопленной дозы [10].

В «гамма-нейтронную» когорту вошли сотрудники института, работавшие на исследовательских установках. Численность когорты составила 107 человек. В «тритиевую» когорту включено 79 сотрудников, которые в процессе производственной деятельности подвергались воздействию бета-излучения трития. Средний возраст в «гамма-нейтронной» когорте составил 64,4 лет, а в «тритиевой» – 61,1 год. Распределение обследованных лиц по возрасту не различались ($p > 0,05$). Средний стаж работы в радиационно-опасных условиях труда в «гамма-нейтронной» когорте составил 38,2 года, а специалисты «тритиевой» когорты проработали в условиях профессиональной вредности в среднем 31,0 год. За период работы уровни облучения в «гамма-нейтронной»

когорте составили от 8,0 до 510,0 сГр (в среднем – 32,6 сГр), а в «тритиевой» когорте эквивалентные дозы были в пределах от 2,0 до 99,4 сЗв (в среднем – 12,5 сЗв).

В соответствии с возрастным распределением в когортах профессионалов была сформирована контрольная когорта. В нее включены сотрудники РФЯЦ-ВНИЭФ, которые в течение трудовой деятельности не подвергались влиянию радиационного и других факторов проф. вредности. Численность контрольной когорты составила 49 человек.

Анализ хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили в соответствии со стандартным протоколом [3]. Культуральная среда RPMI-1640 содержала 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2,5 % фитогемагглютинаина, 10 мМ 5-бромдезоксипуридина и антибиотики. Инкубацию клеточных культур проводили при 37°C в течение 48 часов. Препараты окрашивали с использованием метода «флюоресценция плюс Гимза», позволяющим учитывать хромосомные aberrации в лимфоцитах, находящихся на стадии первого после стимуляции к делению в культуре митотического цикла.

При микроскопировании учитывали все aberrации хромосомного и хроматидного типа, распознаваемые без кариотипирования, согласно общепринятой классификации [11]. В среднем от каждого обследованного анализировали по 1000 метафаз.

По результатам цитогенетического анализа рассчитывали индивидуальные и групповые показатели суммарной частоты хромосомных aberrаций на 100 проанализированных клеток ($ab/100$) по формуле:

$$ab/100 = \frac{ab}{N} \times 100$$

где – ab количество выявленных aberrаций; N – количество проанализированных клеток.

Оценка эффективности УФ-индуцированного репаративного (внепланового) синтеза ДНК в клетках крови

Оценку эффективности внепланового синтеза ДНК (ВС ДНК) проводили по степени включения меченного тритием тимидина после тестирующего УФ-облучения после кратковременной инкубации клеток в питательной среде [7]. Для ингибирования репликативного синтеза ДНК использовали гидроксимочевину. Тимидин, не включенный в цепь ДНК при внеплановом синтезе, осаждали промыванием в трихлороуксусной кислоте на стекловолокнистых фильтрах. Количество радиоактивности в кислотонерастворимой фракции на фильтрах является показателем эффективности ВС ДНК, поскольку оно показывает относительное количество встроившегося при репарации тимидина.

Критерием оценки эффективности репарации служило значение коэффициента ВС ДНК ($K_{уф}$), которое рассчитывали по формуле:

$$K_{уф} = \frac{CPM_{уф}}{CPM_{спонт}}$$

где $CPM_{уф}$ – бета-активность проб крови после УФ-облучения, имп./мин;

$CPM_{спонт}$ – спонтанная бета-активность проб крови, имп./мин.

Методика выделения групп риска

Для выделения из когорт профессионалов групп «риска» и групп «повышенного риска» проводили поэтапный отбор лиц с повышенной частотой хромосомных aberrаций и сниженной эффективностью внепланового синтеза ДНК.

Для этого в каждой из когорт проводили ранжирование в порядке возрастания индивидуальных значений частоты aberrаций. Лица с наименьшими частотами хромосомных aberrаций, не превышающими верхнюю границу 95%-ного доверительного интервала среднего значения в контроле, были включены в группы «вне риска». Из оставшихся профессионалов были сформированы группы «риска» и группы «повышенного риска». Критерием включения обследован-

ного в группы «повышенного риска» являлось индивидуальное значение коэффициента ВС ДНК, которое было ниже границы 95%-ного доверительного интервала для среднего значения в группах «вне риска». Профессионалы, не вошедшие в группы «вне риска» и группы «повышенного риска», составили группы «риска».

Для оценки принадлежности обследованного к одной из сформированных групп применяли множественный линейный дискриминантный анализ Фишера. При проведении анализа использовали модуль «Дискриминантный анализ» программного продукта STATISTICA-6.0 [12]. В качестве статистических переменных были выбраны частота хромосомных aberrаций и значение коэффициента ВС ДНК. В ходе проведения анализа рассчитывали значение лямбды Уилкса и оценивали полученную систему классификационных уравнений. На основании анализа матрицы классификации по проценту корректно классифицированных наблюдений судили о точности выделения групп с различным уровнем цитогенетических нарушений и эффективности внепланового синтеза ДНК.

Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной когорте проанализиро-

вано 51893 метафаз. Среднее значение частоты хромосомных aberrаций, характеризующее спонтанный уровень цитогенетических нарушений, составило $0,92 \pm 0,04$ на 100 клеток. Для 30 человек из контрольной когорты проведена оценка эффективности внепланового синтеза ДНК. Среднее значение коэффициента ВС ДНК составило $1,66 \pm 0,06$.

В «гамма-нейтроной» и «тритиевой» когортах проанализировано 104536 и 67175 метафаз соответственно. В когортах профессионалов частота хромосомных aberrаций была практически одинакова и в среднем превышала спонтанный уровень ~ в 2,0 раза ($p \leq 0,001$). Эффективность внепланового синтеза ДНК в обследованных когортах была снижена относительно контрольного уровня. В «гамма-нейтроной» когорте это снижение было статистически значимо ($p \leq 0,05$), а в «тритиевой» когорте такое снижение было близко по величине, но незначимо [7,8].

В результате поэтапного отбора из когорт профессионалов лиц с различным уровнем цитогенетических нарушений и эффективностью ВС ДНК были сформированы группы «вне риска», «риска» и «повышенного риска». Распределение профессионалов по сформированным группам представлено на рисунке 1.



Рис. 1. Распределение профессионалов по уровню цитогенетических нарушений и эффективности внепланового синтеза ДНК

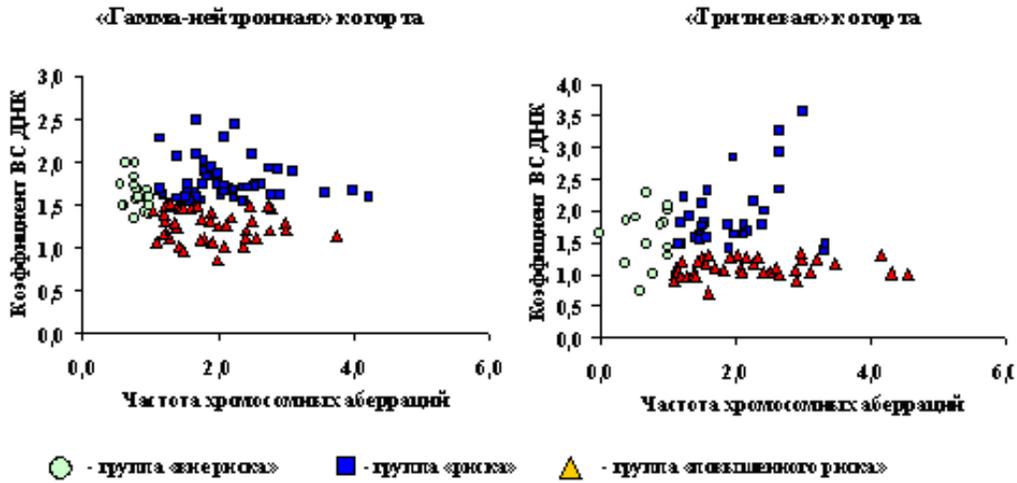


Рис. 2. Соотношение индивидуальных значений коэффициента ВС ДНК и частоты хромосомных aberrаций в выделенных из когорт профессионалов группах

Численность групп «вне риска» составила 17 человек (16% от числа обследованных) в «гамма-нейтронной» когорте и 14 человек (17% от числа обследованных) в «тритиевой» когорте. У лиц, включенных в эти группы, индивидуальные частоты хромосомных aberrаций не превышали спонтанный уровень. При этом средние значения коэффициента ВС ДНК оказались близко к среднему значению в контроле.

У оставшихся профессионалов индивидуальные частоты aberrаций достоверно превышали спонтанный уровень ($p \leq 0,05$).

Анализ эффективности внепланового синтеза ДНК показал, что у 43 человек (40% от числа обследованных) в «гамма-нейтронной» когорте и у 36 человек (45% от числа обследованных) в «тритиевой» когорте повышенный уровень цитогенетических нарушений сопровождался снижением эффективности репарации повреждений ДНК. Эти профессионалы были включены в две группы «повышенного риска». Средние значения коэффициента ВС ДНК в обеих группах «повышенного риска» были в $\sim 1,3$ раза ниже средних значений в группах «вне риска» ($p \leq 0,001$).

Остальные специалисты – 47 человек (44% от числа обследованных) в «гамма-нейтронной» когорте и 29 человек (38% от

числа обследованных) в «тритиевой» когорте – вошли в соответствующие группы «риска». У обследованных из этих групп на фоне повышенной частоты aberrаций не выявлено изменений эффективности репаративного синтеза ДНК. Картина соотношения индивидуальных значений коэффициента ВС ДНК и частоты хромосомных aberrаций в сформированных таким образом группах представлена на рисунке 2.

Выявлено, что в когортах профессионалов между группами «вне риска», «риска» и «повышенного риска» существуют выраженные различия. При этом частота хромосомных aberrаций и коэффициент ВС ДНК как критерии формирования групп с различным уровнем цитогенетических нарушений и репарационным статусом обладают средней, но высокосignификантной дискриминационной способностью ($p \leq 0,000000$).

В результате проведенного дискриминантного анализа для каждой выделенной из когорт профессионалов группы были получены аналитические выражения дискриминантных функций вида:

$$D = a_1 + a_2 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + a_3 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

где D – классификационное число; a_1, a_2, a_3 – коэффициенты классифицирующих функций.

Используя систему классификационных уравнений, по индивидуальной частоте хромосомных aberrаций и значению коэффициента ВС ДНК можно отнести обследованного работника к той или иной выделенной группе:

– для обследованных «гамма-нейтронной» когорты;

$$D_{\text{ВНЕ_РИСКА}} = -34,74 + 3,84 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 38,82 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

$$D_{\text{РИСКА}} = -47,83 + 7,51 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 43,97 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

$$D_{\text{ПОВЫШ_РИСКА}} = -26,99 + 6,34 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 31,76 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

– для обследованных «тритиевой» когорты;

$$D_{\text{ВНЕ_РИСКА}} = -9,74 + 0,28 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 9,92 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

$$D_{\text{РИСКА}} = -14,53 + 2,38 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 11,45 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

$$D_{\text{ПОВЫШ_РИСКА}} = -7,80 + 3,41 \times \text{ЧАСТОТА_АБЕРРАЦИЙ} + 5,77 \times \text{КОЭФФИЦИЕНТ_ВС_ДНК}$$

Подставляя индивидуальные значения показателей в каждое из уравнений, можно

определить к какой из групп относится каждый обследованный. При этом классификационное число (D) должно быть максимальным.

Итоговая матрица классификации принадлежности обследованных из когорты профессионалов к той или иной выделенной группе представлена в таблице 1. Анализ матрицы классификации выявил, что 88,8% обследованных лиц в «гамма-нейтронной» когорте и 87,3% в «тритиевой» когорте были правильно отнесены к той или иной группе.

Заключение

Установлено, что в обследованных когортах профессионалов-атомщиков, специалистов ядерного центра, имеется ярко выраженная неоднородность как по уровню цитогенетических нарушений, так и по эффективности внепланового синтеза ДНК.

У незначительной части профессионалов (около 17% от числа обследованных) индивидуальные значения частоты хромосомных aberrаций оказались близки к спонтанному уровню. В группах «вне риска» не выявлено существенных изменений репарационного статуса клеток крови.

Таблица 1
Классификационная матрица принадлежности обследованных из когорты профессионалов к выделенным группам

Когорта	Группа	Корректно классифицированные случаи, %	Распределение обследованных по группам, n			Всего, n
			«Вне риска»	«Риска»	«Повышенного риска»	
«Гамма-нейтронная» когорта	«Вне риска»	82,4	14	0	3	17
	«Риска»	87,2	4	41	2	47
	«Повышенного риска»	93,0	0	3	40	43
	Итого:	88,8	18	44	45	107
«Тритиевая» когорта	«Вне риска»	64,3	9	3	2	14
	«Риска»	82,8	2	24	3	29
	«Повышенного риска»	100,0	0	0	36	36
	Итого:	87,3	11	27	41	79

У подавляющего большинства профессионалов индивидуальные значения частоты aberrаций превышали спонтанный уровень, что послужило основанием для включения этих обследованных работников в группы «риска» и «повышенного риска». Среди профессионалов этих групп можно ожидать увеличение частоты радиационно-индуцированных онкологических и соматических патологий.

Более чем у трети обследованных лиц увеличение частоты хромосомных aberrаций сопровождалось значимым снижением эффективности репаративного синтеза ДНК. Профессионалы, вошедшие в группы «повышенного риска», в первую очередь должны обследоваться с применением современных медицинских технологий ранней диагностики заболеваний.

Таким образом, повышенная частота хромосомных aberrаций и сниженная эффективность внепланового синтеза ДНК могут служить взаимодополняющими критериями для выделения групп риска среди облученных лиц.

Список литературы

1. ICRP publication 103: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection / Под ред. Л.-Э. Холма. Пер. с англ. под общей ред. М. Ф. Киселёва, Н. К. Шандалы. – М.: ООО ПКФ «Алана», 2009. – 344 с.

2. IAEA publication: Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical report series No 450. –Vienna: IAEA, 2001. –127 p.

3. Снигирева, Г.П. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов: Медицинская технология. Регистрационное удостоверение № ФС-2007/015У / Г.П. Снигирева [и др.] -М.: 2007. –29 с.

4. Norppa, H. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk / H. Norppa [e.a.] // Mutat. Res. -2006. –V.600. – N.1-2. –P.37–45.

5. Ozery-Flato, M. Large-scale analysis of chromosomal aberrations in cancer karyotypes reveals two distinct paths to aneuploidy / M. Ozery-Flato [e.a.] // Genome Biology. -2011.- V.12. – Is.6. // doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r61

6. Matta, J. The association of DNA Repair with breast cancer risk in women. A comparative observational study / J. Matta [e.a.] // BMC Cancer. -2012. –V.12. -Is.490. //doi: 10.1186/1471-2407-12-490

7. Никанорова, Е.А. Изучение репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах профессионалов-атомщиков / Е.А. Никанорова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2002. -Т.42. -№6. -С.759-764

8. Никанорова, Е.А. Сравнительный анализ генетических эффектов радиационного воздействия и эффективности репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах профессионалов-атомщиков / Е.А. Никанорова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия «Биология». -2006. -Вып.1(11). -С.111–119

9. Снигирева, Г.П. Цитогенетическое обследование профессионалов-атомщиков, подвергавшихся хроническому воздействию β-излучения трития / Снигирева Г.П. [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т.49. -№1. -С.60-66

10. Горбунова, И.Н. Реконструкция поглощенных доз по частоте у профессионалов-атомщиков в отдаленные сроки после облучения с помощью цитогенетических методов / И. Н. Горбунова [и др.] // «Сб. материалов 2-й межотрасл. научно-технич. конф. «Охрана природы и экологическая безопасность на предприятиях Минатома». – Саров: изд-во РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2002. – С. 225–233.

11. Захаров, А.Ф. Хромосомы человека (атлас) / А.Ф. Захаров [и др.] – М.: Медицина, 1982 – 264 с.

12. Халафян, А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А Халафян. – М.: Бином-Пресс, 2008. – 512 с.