

**Федеральный медицинский
биофизический центр
им. А.И. Бурназяна**

В.Ю. Нугис

*Цитогенетические методы оценки
неравномерности радиационного
воздействия*

Определение биологической дозиметрии (по M.L.Mendelsohn, 1991)

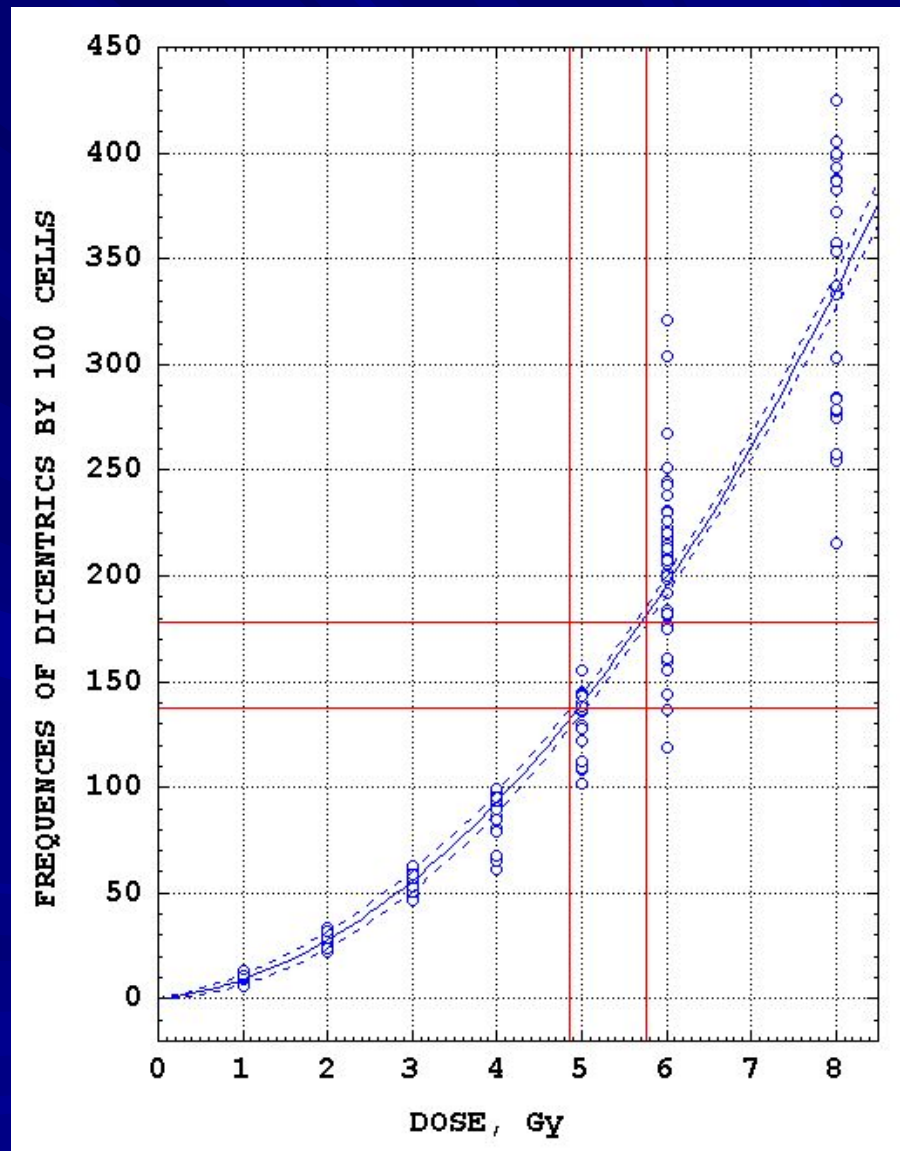
**Оценка величины дозы предшествующего
воздействия путём измерения любыми
методами (физическими, химическими,
биологическими, клиническими)
произошедших изменений в биологических
объектах или извлечённых из них
субстратов**

К вопросу о терминах

- **Необходимость развития методов биологической дозиметрии обусловлена тем, что объективно более точная физическая дозиметрия после случайного воздействия радиации часто бывает недоступна, т.к., если и есть физический дозиметр (у профессионалов, у других лиц он отсутствует), то он скорее всего не предназначен для учёта высоких воздействий, расчётный же метод ограничен наличием достоверных сведений о временных и геометрических характеристиках облучения, обычно воспроизводимых со слов пострадавшего.**
- **Биологическая дозиметрия – это часто применяемый термин, но он некорректен с физической точки зрения. Действительно, доза есть количество энергии, поглощённой единицей массы вещества. Однако величина биологического эффекта зависит не только от дозы. Другие характеристики облучения, например, его вид, энергия, длительность и фракционированность, влияют на величину пострadiационных изменений биологического материала. Также и состояние самого этого биологического материала влияет на пострadiационные эффекты.**
- **Поэтому более правильно говорить о биологической индикации дозы.**

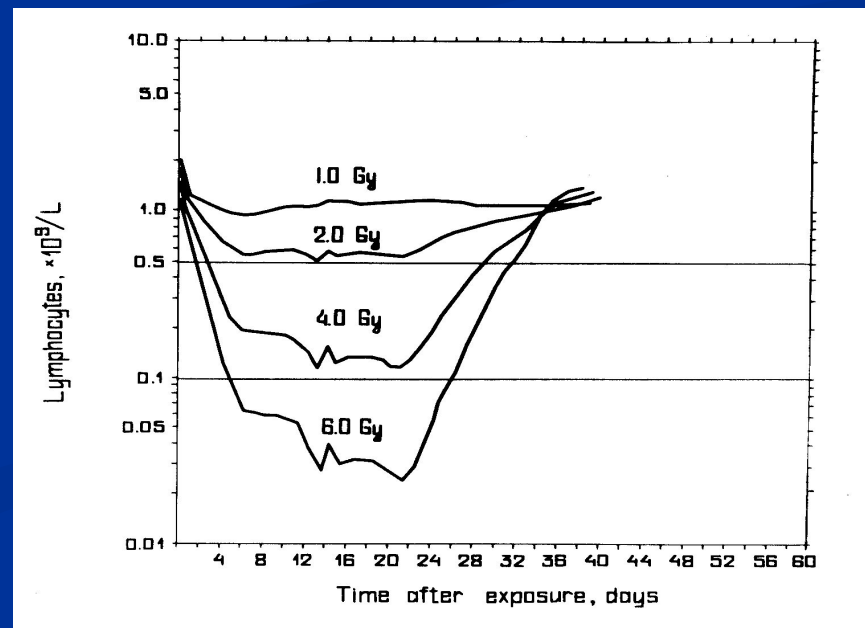
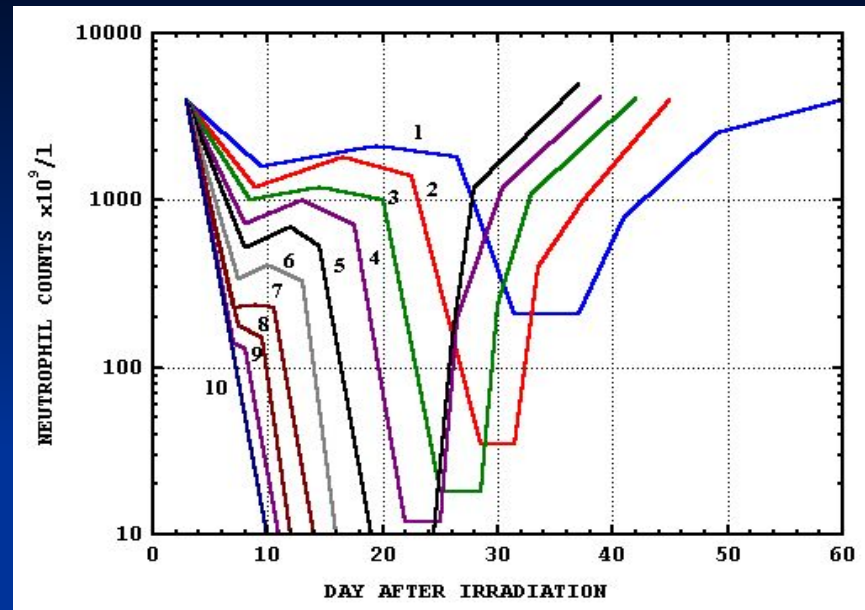
Цитогенетическая оценка дозы по средней частоте дицентриков в культурах лимфоцитов периферической крови

Оценка средней поглощённой дозы на всё тело основана на определении средних частот дицентриков в культурах лимфоцитов периферической крови. В качестве калибровочной кривой применяется линейно-квадратичная зависимость доза-эффект, построенная после гамма-облучения (^{60}Co) крови здоровых доноров *in vitro*, так как показано, что радиочувствительность хромосом лимфоцитов при воздействии радиации *in vivo* и *in vitro* примерно одинакова. Каждой лаборатории предлагается иметь свои собственные калибровочные кривые. Это связано с существенной межлабораторной вариабельностью, наблюдающейся при анализе радиационно-индуцированных хромосомных повреждений в культурах лимфоцитов периферической крови. При этом очень важную роль играют различия в критериях отбора метафаз для анализа и идентификации aberrаций хромосом. Такая оценка дозы наиболее эффективна в случаях острого относительно равномерного радиационного воздействия.



Прогноз тяжести костномозгового синдрома

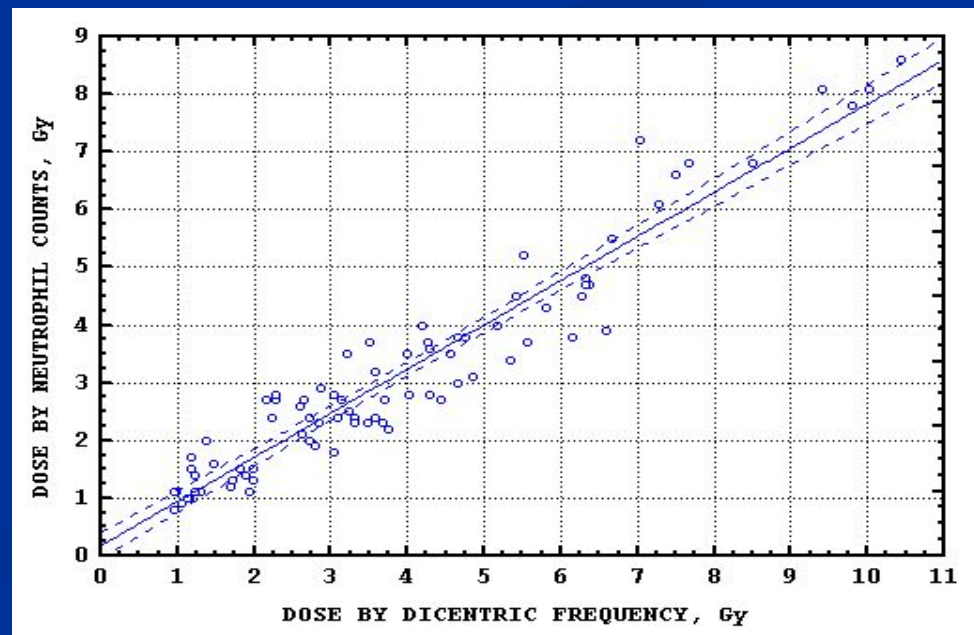
- При обследовании пациентов с ОЛБ оценка полученной дозы важна для выбора тактики лечения на основе определения тяжести заболевания и прогноза течения основных синдромов острого радиационного поражения, к которым относится и костно-мозговой синдром.
- Ещё в дочернобыльский период были построены дозовые зависимости для пострadiационной динамики числа нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в крови после терапевтического и аварийного гамма-облучения (этим частично обусловлено использование гамма-эффективного эквивалента дозы). На верхнем рисунке представлены такие дозовые кривые для нейтрофилов, на нижнем — для лимфоцитов. Отметим, что картина изменения числа нейтрофилов является интегральным показателем тяжести перенесенного поражения кроветворения, однако в целом она относится к поздним индикаторам дозы, и, собственно говоря, и является объектом предсказания для таких ранних показателей как абберации хромосом и динамика числа лимфоцитов



Прогноз тяжести костномозгового синдрома: ЧАЭС

В Таблице приведена группировка 158 пострадавших в зависимости от цитогенетически оцененной дозы. Из Рисунка видно, что у них была обнаружена тесная корреляция между оценками доз по цитогенетическим и гематологическим данным, причем длительность пребывания пациентов в зоне облучения не влияла на эту зависимость. Также можно заметить и систематическое отклонение дозовых показателей кривых нейтрофилов в данной группе пациентов от полученных ранее зависимостей. Это стало особенно явно, когда на данном материале были получены новые дозовые кривые нейтрофилов. Не ясно, связаны ли эти различия с простым увеличением числа пациентов, или с особенностями радиационного воздействия при аварии на Чернобыльской АЭС (фракционирование и пролонгирование).

Диапазон средних оценок доз на всё тело, Гр	Число пациентов
10,4 – 15,2	10
6,1 – 10,0	16
4,0 – 5,8	18
2,0 – 3,7	33
1,0 – 1,9	22
0,2 – 0,8	33
дицентрики не найдены	26



Неравномерное облучение: метод Dolphin

$$Y / (1 - e^{-Y}) = X / (N - n_0) \quad (1)$$

$$Y \times f = X / N, \quad (2)$$

где

f – доля облучённых клеток,

Y – частота дицентриков на 1 клетку,

N – число сосчитанных клеток,

X – число наблюдаемых дицентриков,

n₀ – число клеток без дицентриков.

Неравномерное облучение: Qdr-метод

$$Q_{dr} = X / N_U = Y_{DR} / [1 - \exp(-Y_{DR} - Y_{Ac})], \quad (3)$$

где

X – наблюдаемое число дицентриков +
центрических колец,

N_U – число клеток с нестабильными
абберациями хромосомного типа,

Y_{DR} и Y_{Ac} – функции дозовой (D) зависимости
частот дицентриков + центрических колец и
ацентриков соответственно.

$$Q_{dr} = (c_{DR} + a_{DR} \times D + b_{DR} \times D^2) / [1 - \exp(-c_{DR} - a_{DR} \times D - b_{DR} \times D^2 - c_{Ac} - a_{Ac} \times D - b_{Ac} \times D^2)]$$

Неравномерное облучение: соотношение

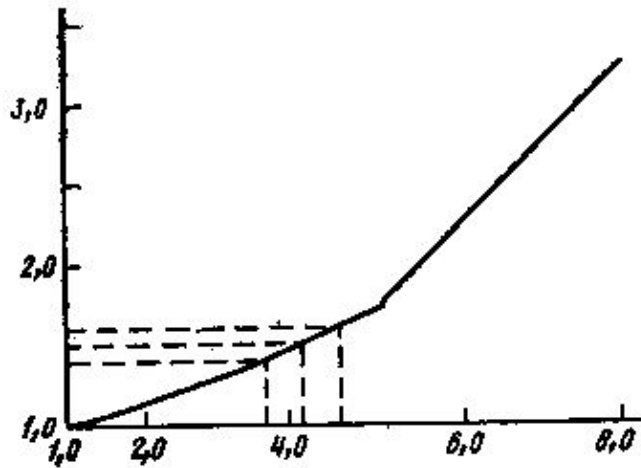


Рис. 1. Зависимость частоты дицентриков (на 1 клетку с дицентриками) в лимфоцитах человека от дозы после γ -облучения *in vitro*

По оси абсцисс — доза облучения, Гр; по оси ординат — число дицентриков на 1 клетку с дицентриками.

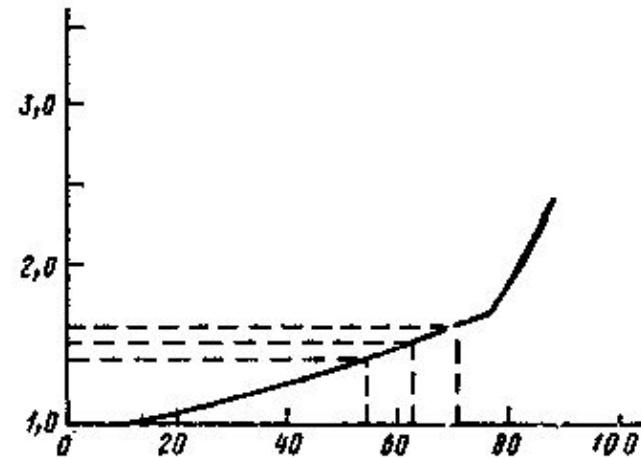


Рис. 2. Зависимость частоты дицентриков (на 1 клетку с дицентриками) в лимфоцитах человека от процента клеток с дицентриками после γ -облучения *in vitro*.

По оси абсцисс — количество клеток с дицентриками, %; по оси ординат — число дицентриков на 1 клетку с дицентриками.

$F = (N_d / NP_d) \times 10^4$, где F — процент облучённых лимфоцитов во всей их популяции, N — общее число проанализированных клеток, N_d — наблюдаемое число клеток с дицентриками, P_d — % клеток с дицентриками, соответствующий наблюдаемой частоте дицентриков на 1 клетку с дицентриками при равномерном облучении.

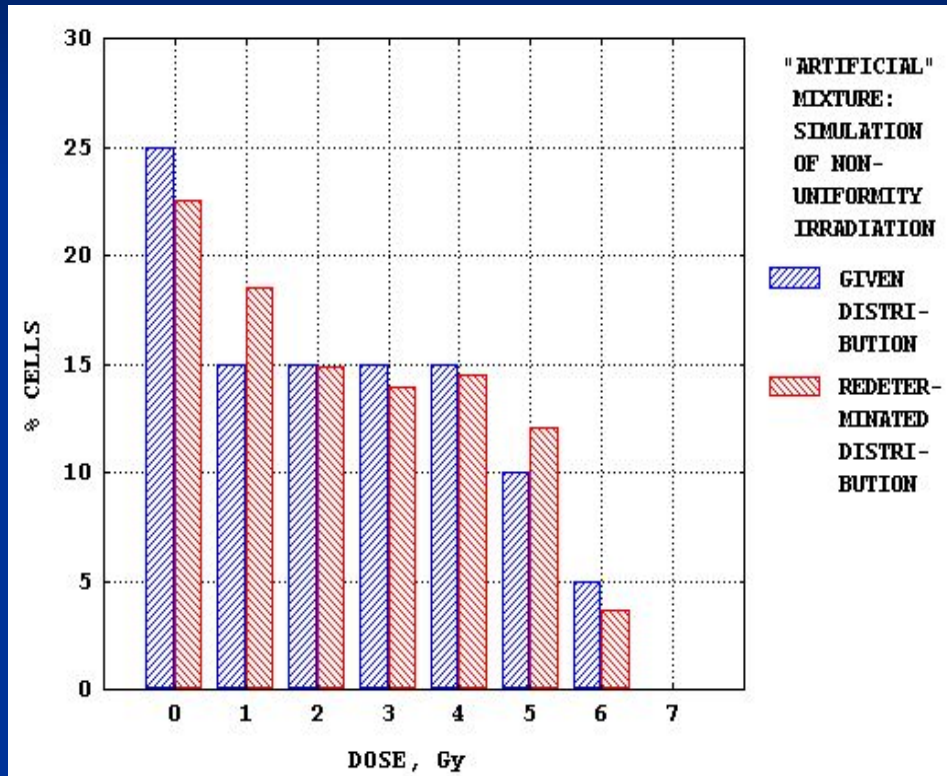
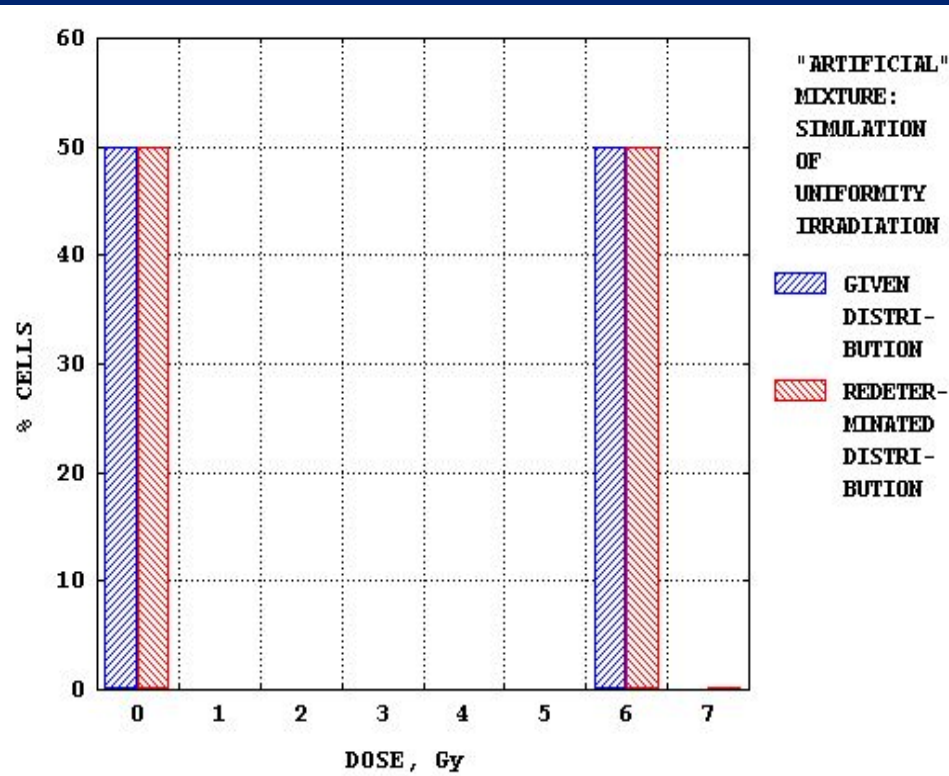
Неравномерное облучение: компьютерный метод

$$F(n) = \int f(D)F[n, Y(D)]dD, \quad (4)$$

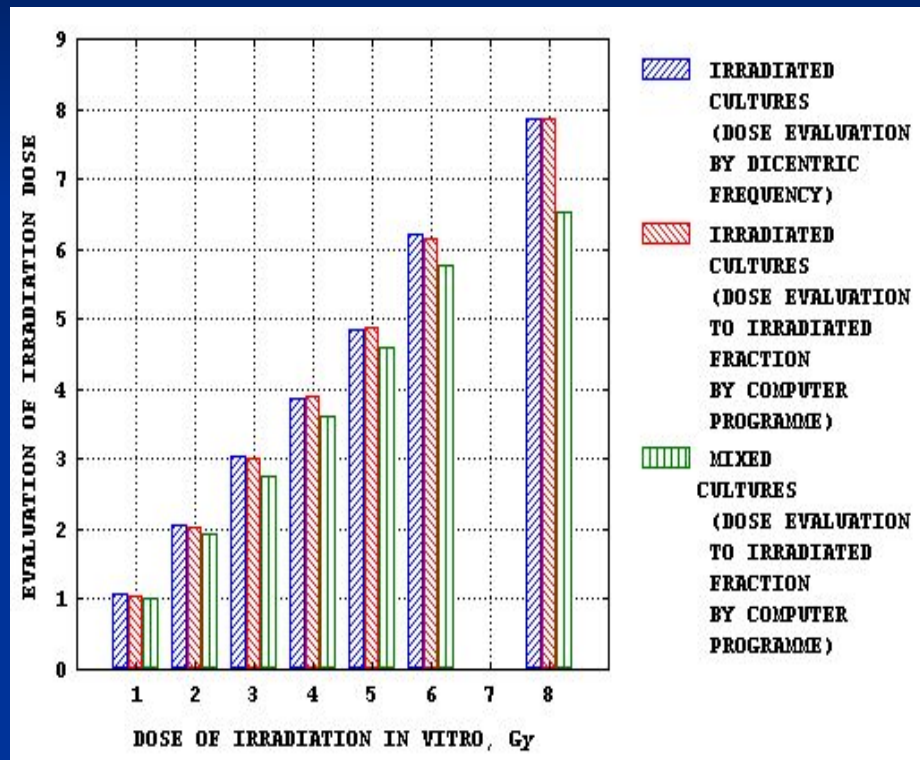
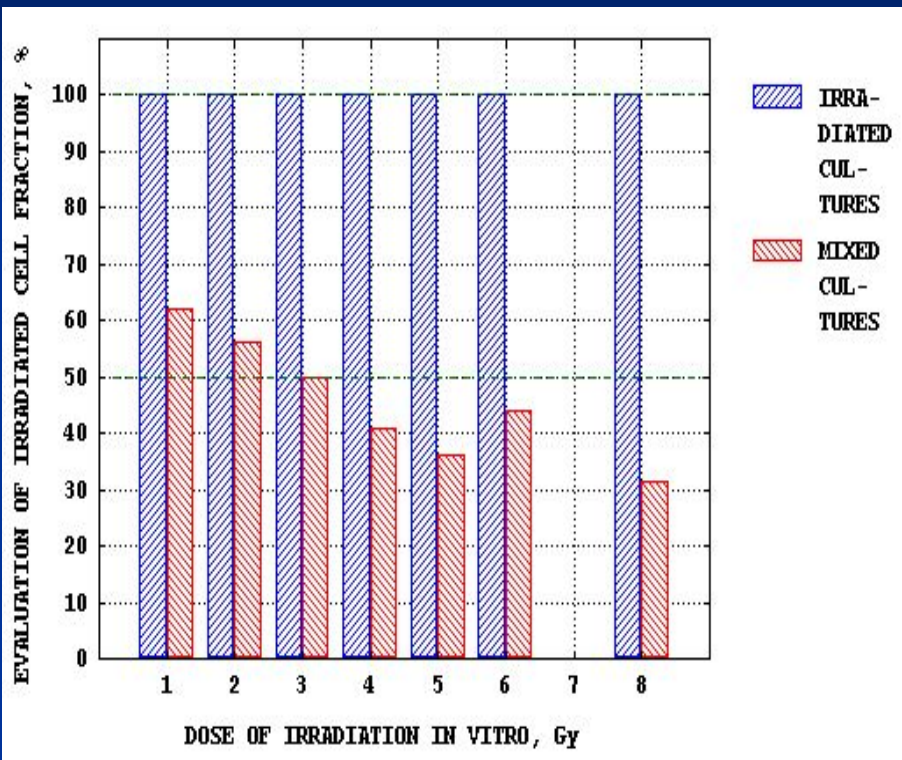
где $f(D)$ – искомое распределение лимфоцитов по полученной дозе, $F(n)$ – эмпирическое распределение лимфоцитов по числу содержащихся в них дицентриков, n – частота дицентриков на 1 клетку, $F[n, Y(D)]$ – аналитически заданное распределение Пуассона со средней величиной Y , $Y(D)$ – аналитически заданная калибровочная зависимость от дозы среднего числа дицентриков на 1 клетку, D – доза, Гр.

$$\int f(D)dD = \sum F[n, Y(D)] = \sum F(n) = 1 \quad (5)$$

Неравномерное облучение: компьютерный метод

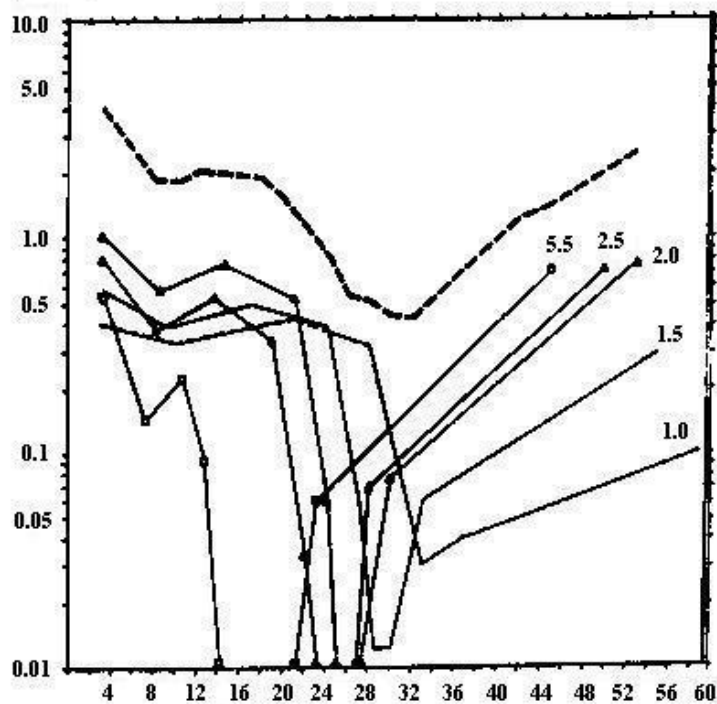


Неравномерное облучение: компьютерный метод



Пример предсказания кинетики нейтрофилов крови методом парциальных кривых у пациента с неравномерным облучением (Varanov A.E. et al., 1990): А) парциальные кривые (сплошные линии), соответствующие следующим долям костного мозга, облучённым в дозах: 1.0 Гр – 0.10; 1.5 Гр – 0.15; 2.0 Гр – 0.25; 2.5 Гр – 0.20; 5.5 Гр – 0.15 и 9.5 Гр – 0.15 (эта парциальная кривая не показана) и суммарная предсказываемая кривая (пунктир); В) реальная кривая пациента (сплошная линия); суммарная предсказываемая кривая (пунктир); стандартная кривая нейтрофилов для средней поглощённой дозы 3.4 Гр

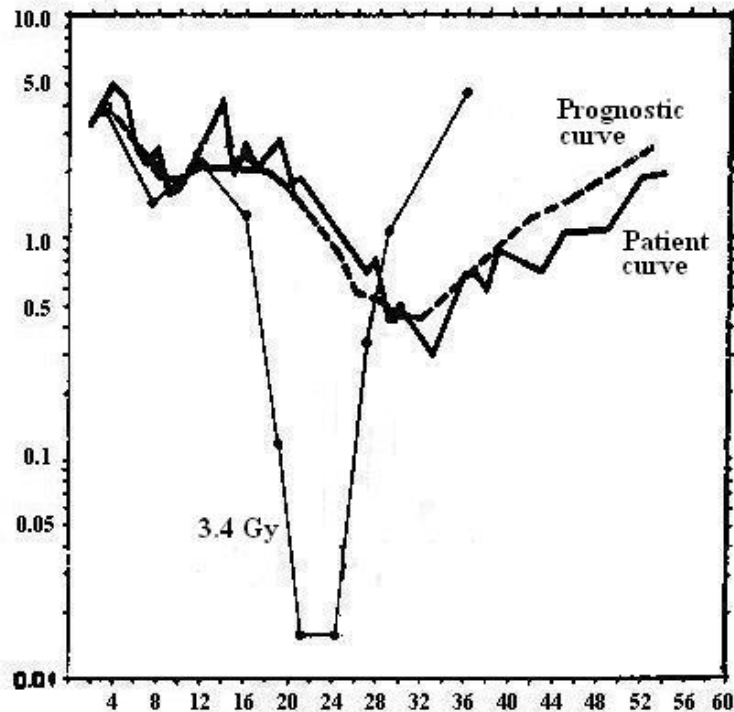
Neutrophils, $\times 10^9/L$



A

Time after exposure, days

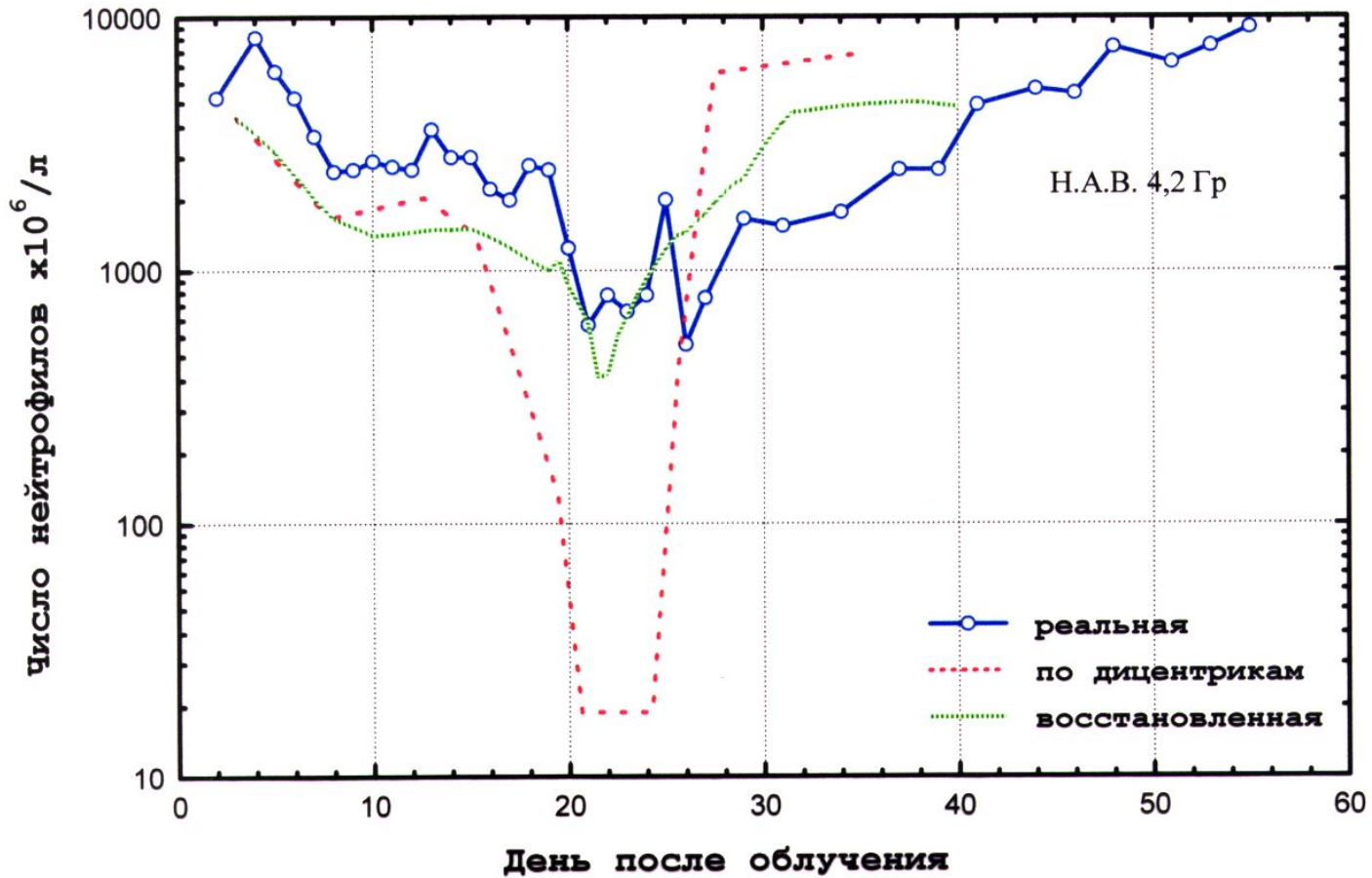
Neutrophils, $\times 10^9/L$



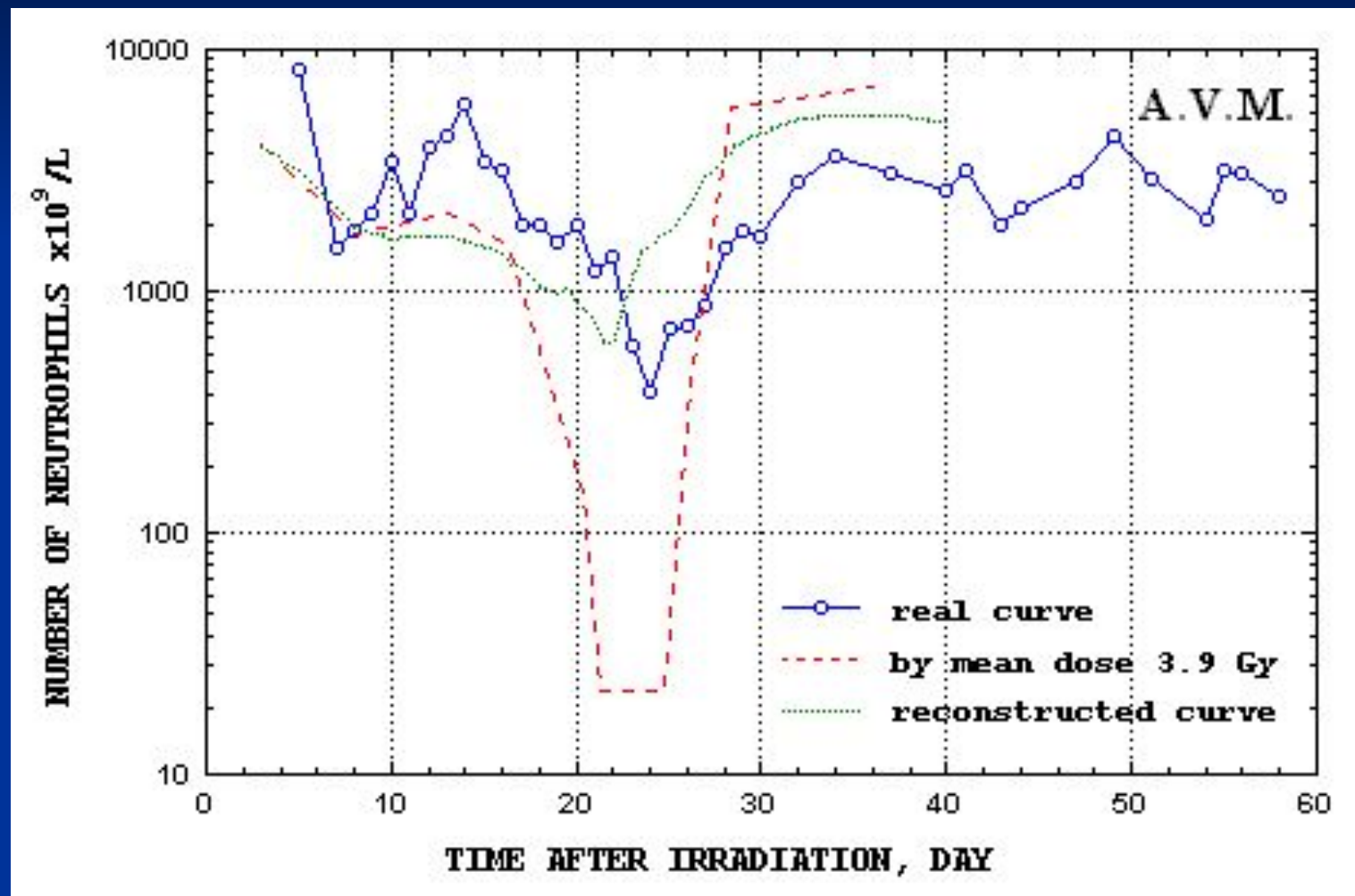
B

Time after exposure, days

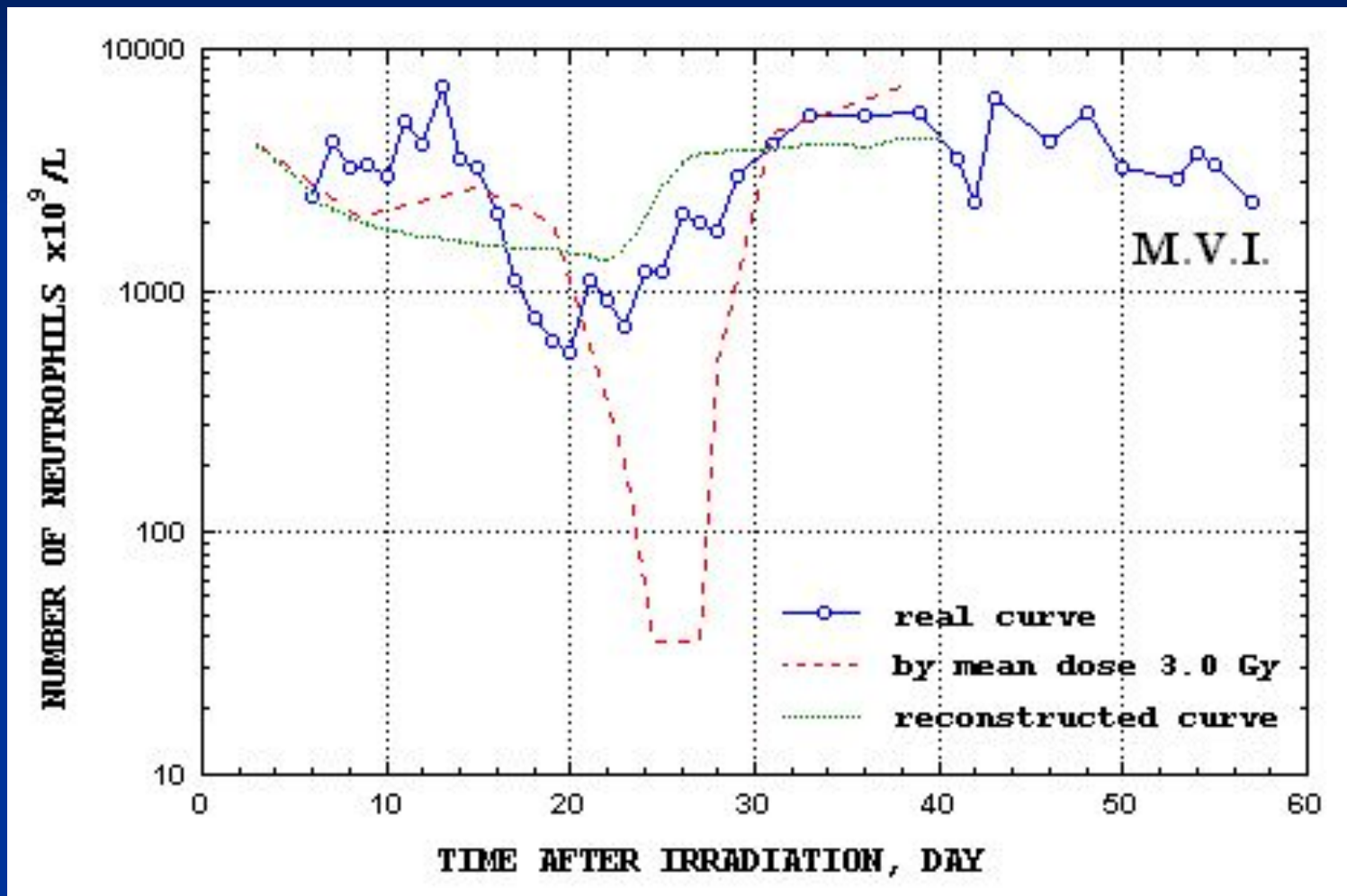
Неравномерное γ -облучение: восстановление кривых нейтрофилов с помощью компьютерного метода



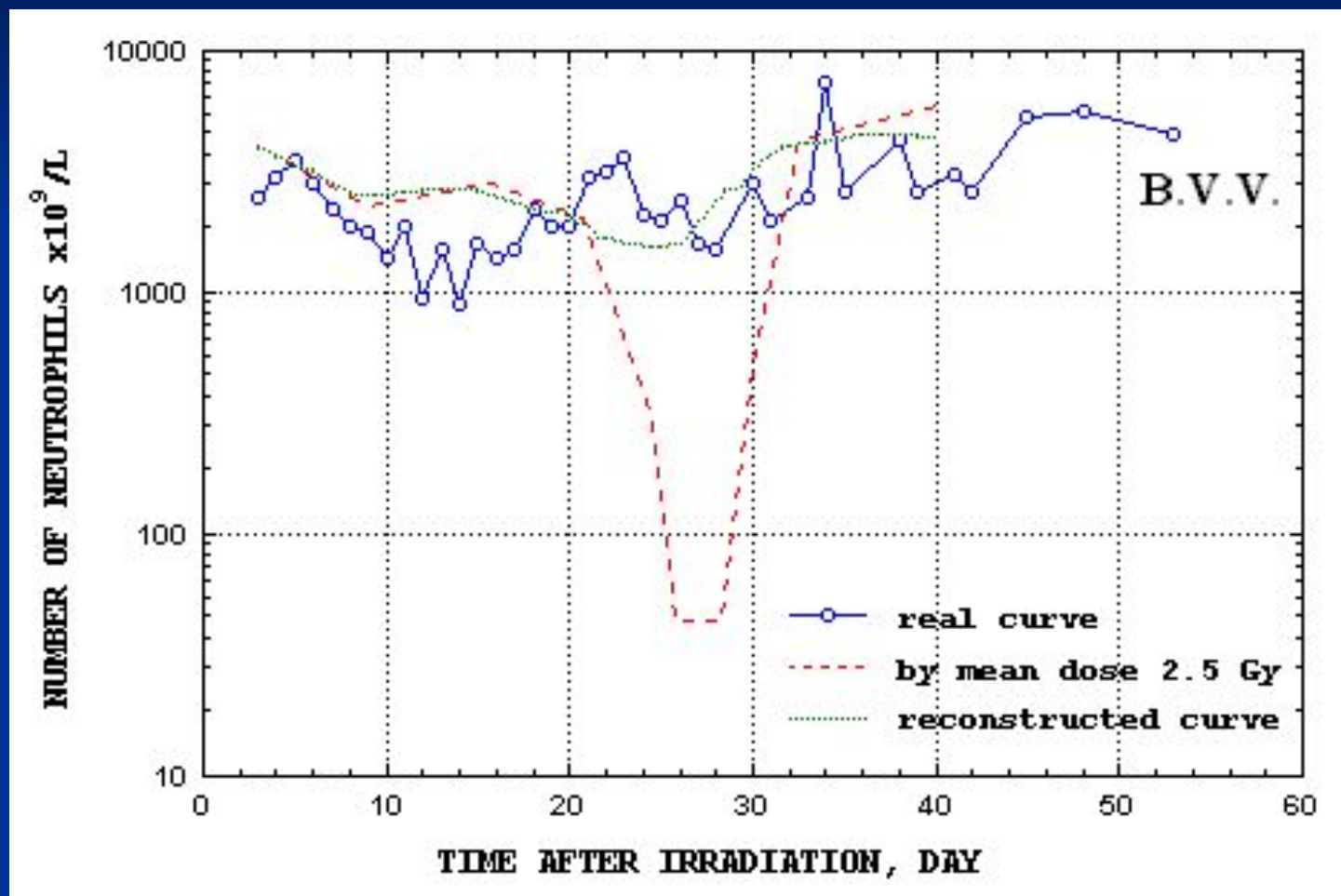
Неравномерное γ -облучение: восстановление кривых нейтрофилов с помощью компьютерного метода



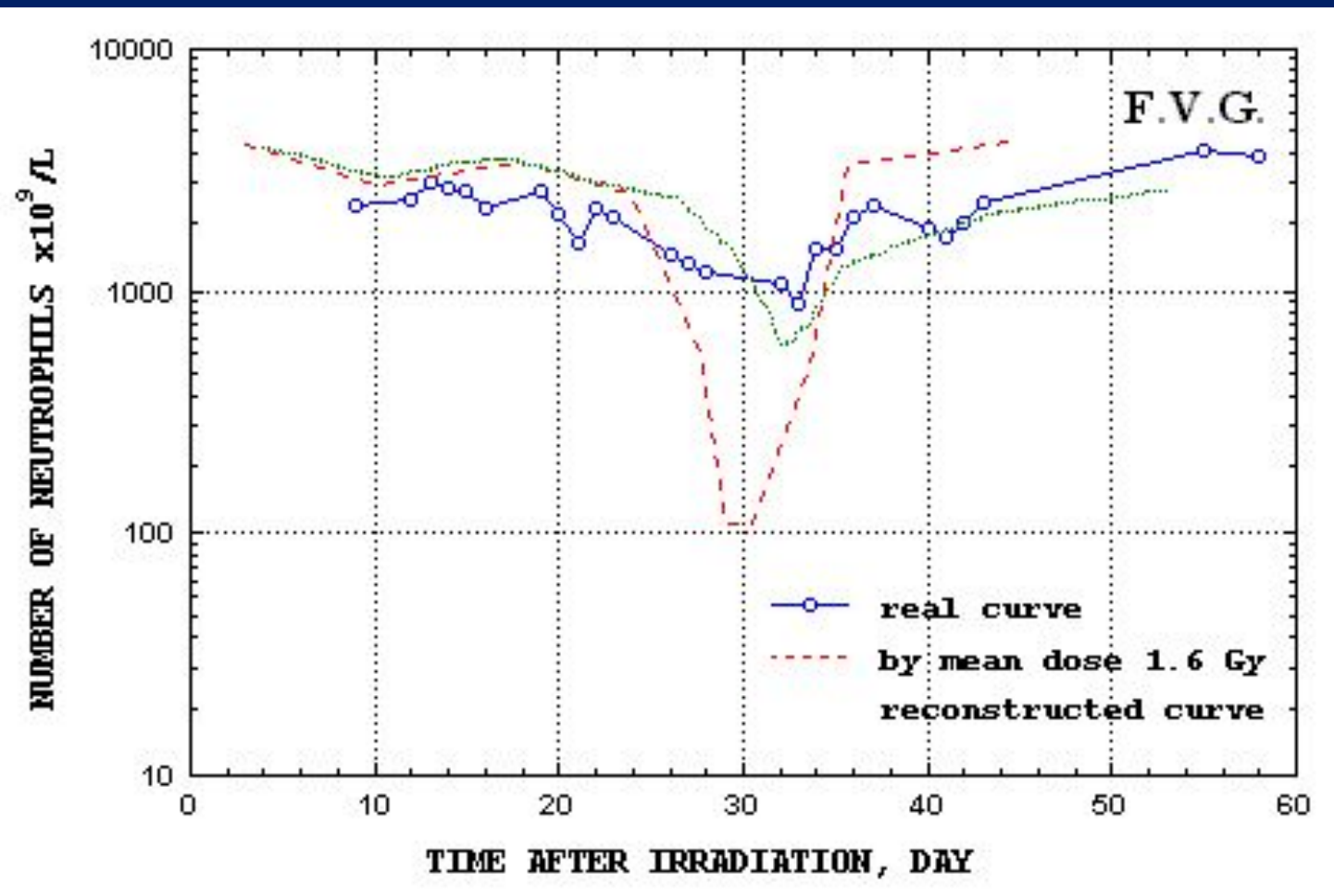
Неравномерное γ -облучение: восстановление кривых нейтрофилов с помощью компьютерного метода



Неравномерное γ -облучение: восстановление кривых нейтрофилов с помощью компьютерного метода

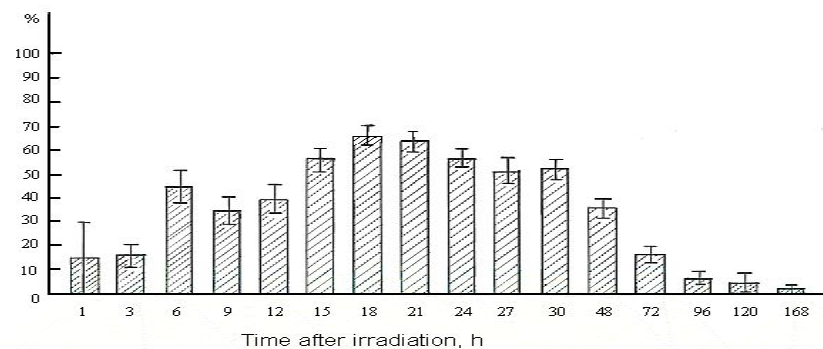
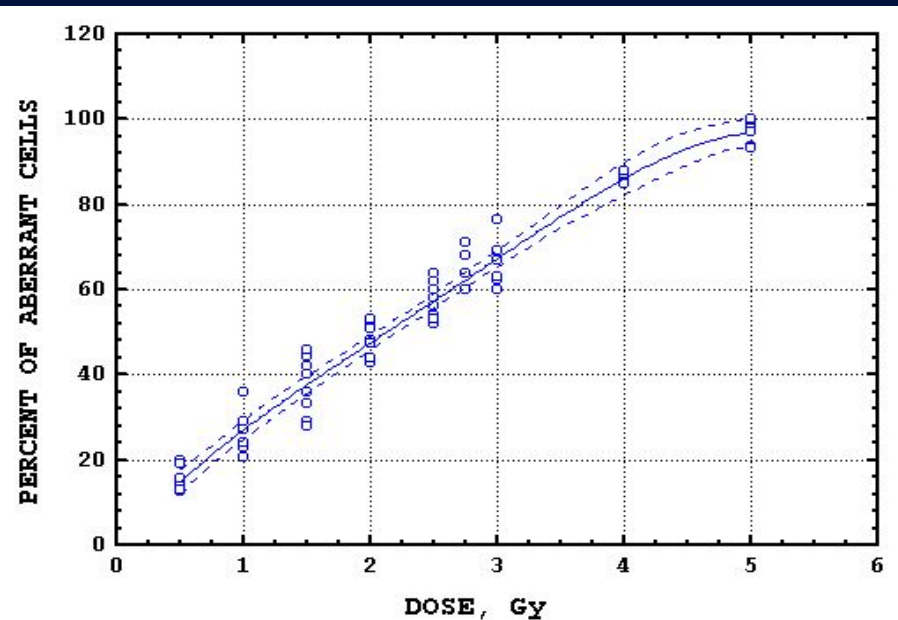


Неравномерное γ -облучение: восстановление кривых нейтрофилов с помощью компьютерного метода



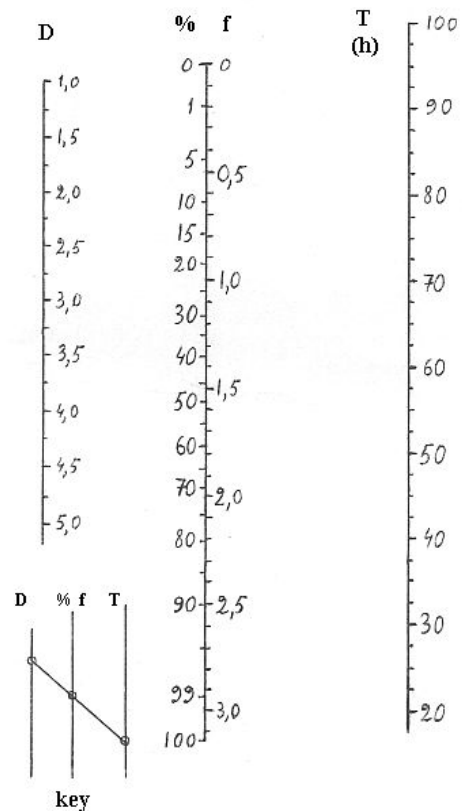
Цитогенетическая оценка дозы: неравномерность облучения

Дозы непосредственно на гемопоэтическую ткань могут быть определены по результатам цитогенетического исследования пунктатов костного мозга, полученного из участков, доступных для пункции (грудина, передняя и задняя ости подвздошных костей справа и слева, остистые отростки грудных позвонков). Для оценки дозы цитогенетический анализ производится в «прямых» (т.е. без культивирования) препаратах хромосом клеток костного мозга, взятого из различных участков. На верхнем рисунке приведена дозовая зависимость в диапазоне 0,5-5 Гр для процента aberrантных клеток через 24 после облучения. Однако костный мозг является активно пролиферирующей клеточной системой, что приводит к быстрой элиминации aberrантных клеток. На нижнем рисунке представлен пример изменения их частоты в различные промежутки времени от 1 до 168 ч после локального гамма-облучения в дозе 2,5 Гр.



Цитогенетическая оценка дозы: неравномерность облучения

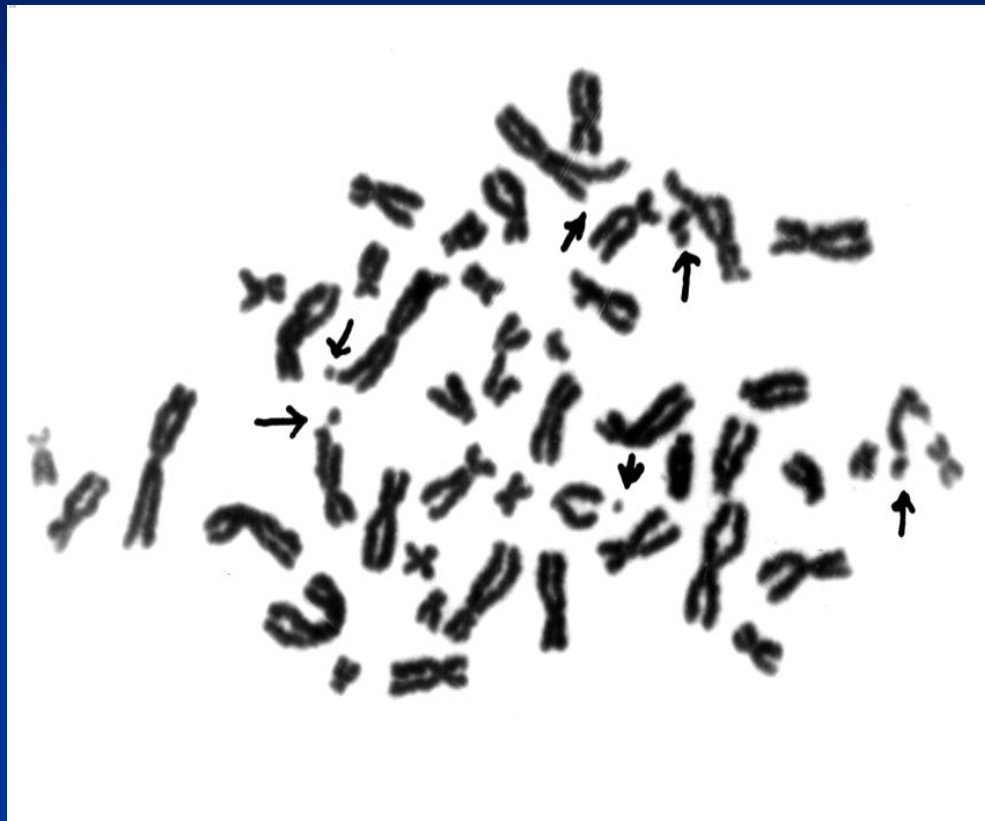
Возникает необходимость учесть элиминацию аберрантных клеток с течением времени и иметь возможность использовать метод анализа “прямых” препаратов хромосом клеток костного мозга для оценки локальных доз в сроки, превышающие 24 ч после облучения. Поэтому была получена единая зависимость доли клеток с абберациями хромосом в костном мозге от величины поглощённой дозы и времени, прошедшего после облучения. Эта зависимость представлена в виде номограммы, позволяющей производить оценку доз графически, не прибегая к вычислениям. Ошибка при расчете дозы не должна быть больше $\pm 11\%$. Однако возможность дозовых оценок по данной схеме не превышает 4 суток после воздействия, так как при больших сроках обнаруживаемая частота аберрантных клеток может не отличаться от спонтанных значений. Также имеется дозовое ограничение в связи с тем, что частота аберрантных клеток при анализе через 24 ч после облучения достигает 100% уже при дозе 5 Гр. При больших дозах возможна только экспертная оценка.



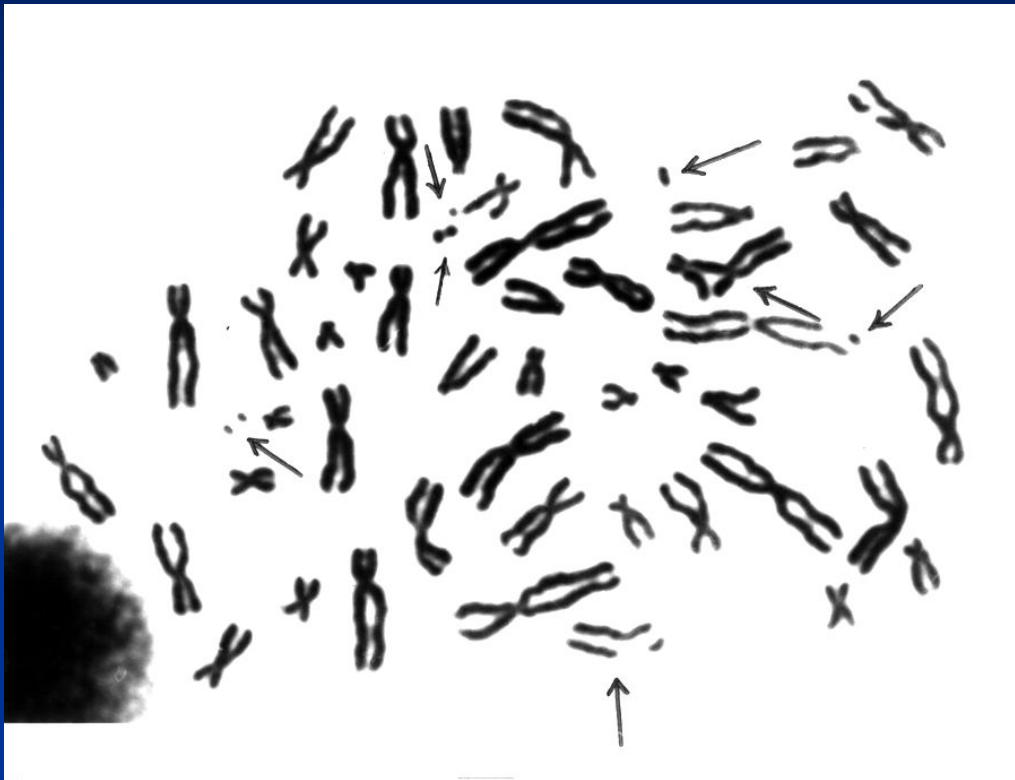
$$P = [\sin(f/2)]^2 * 100,$$

P - percentage of aberrant cells in bone marrow,
 $f = 1,445 + 0,286 * D - 0,0177 * T$
(D - dose, Gy; T - time after irradiation, h)

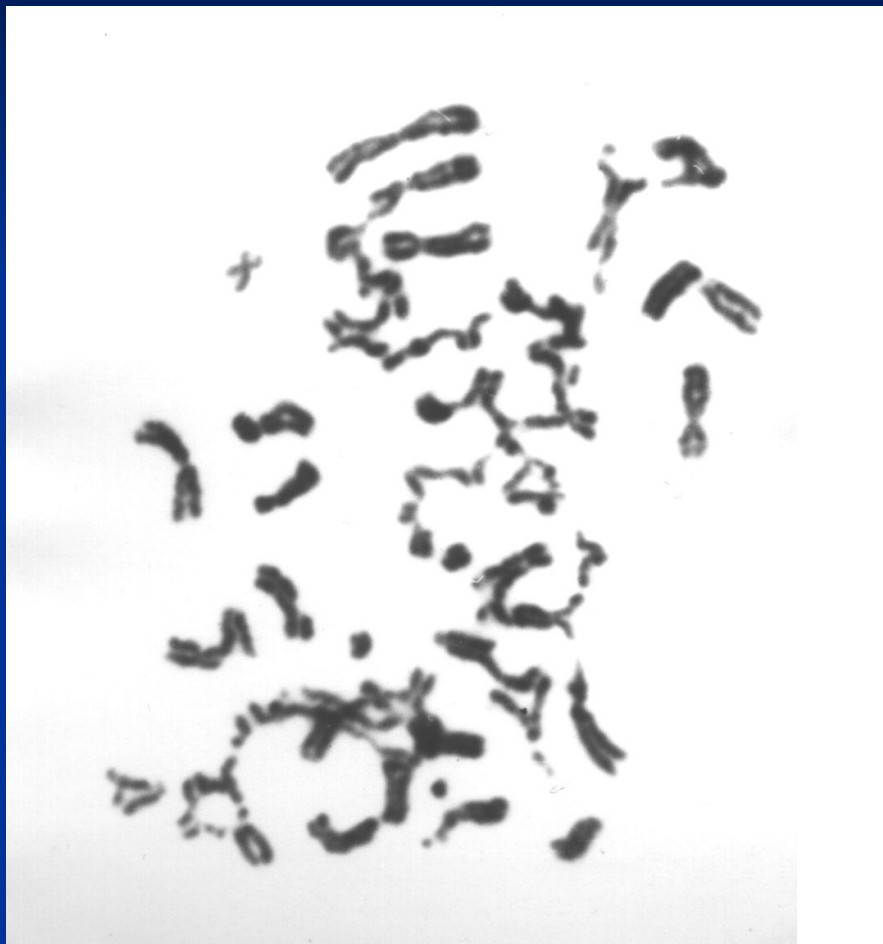
Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга



Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга



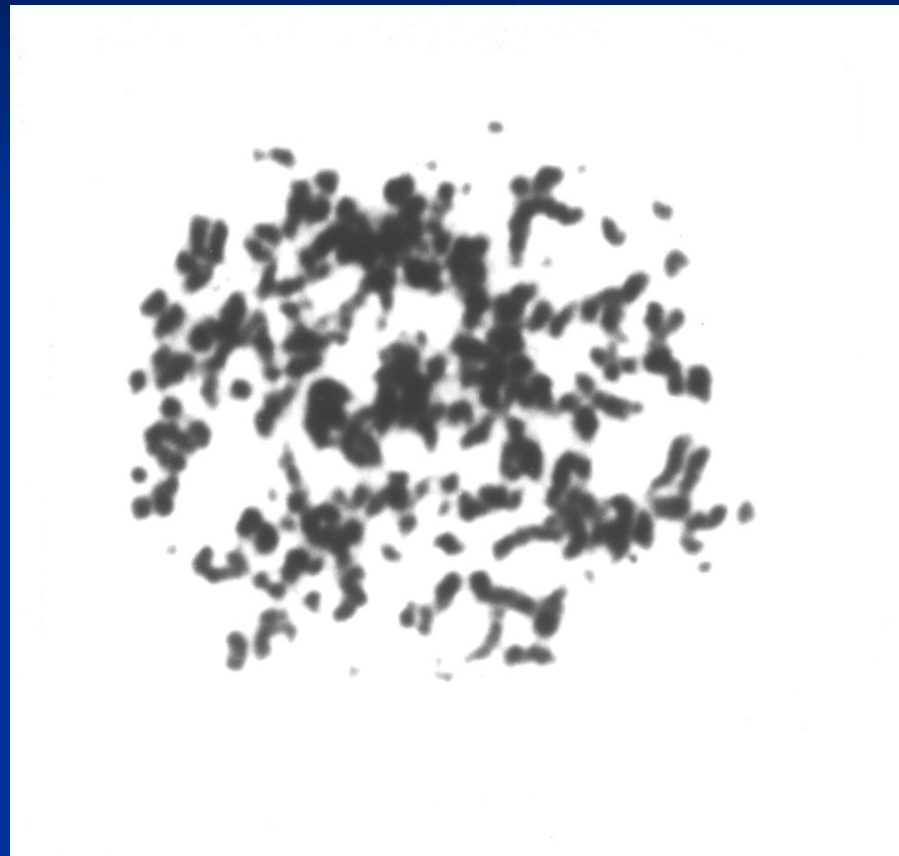
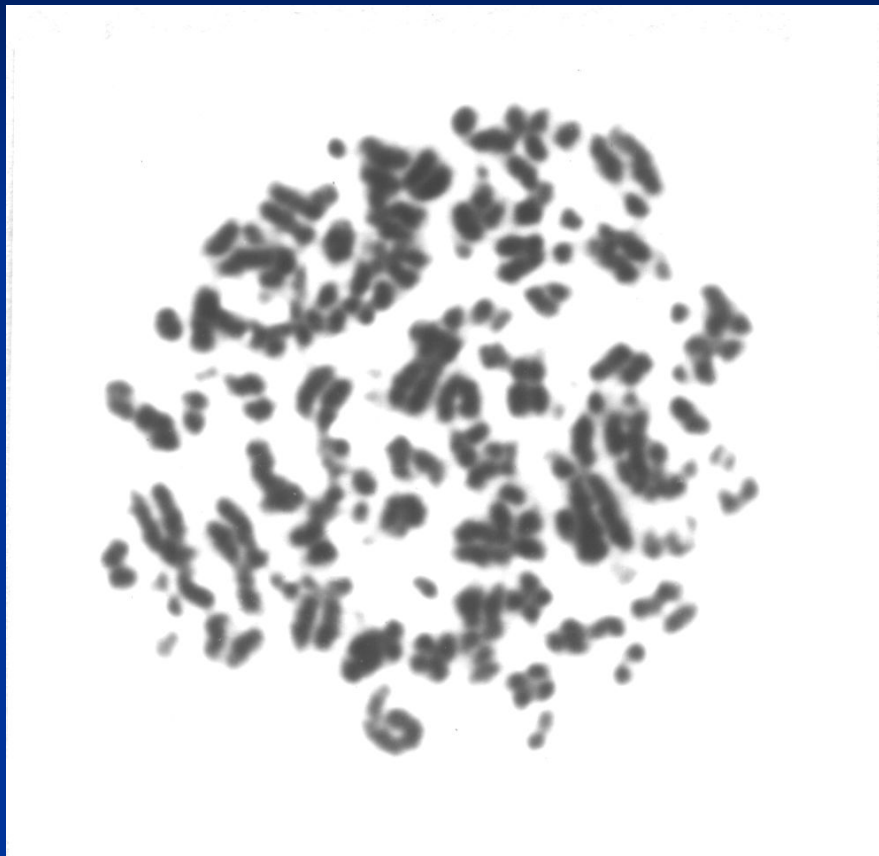
**Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга
(дозы 4-6 Гр)**



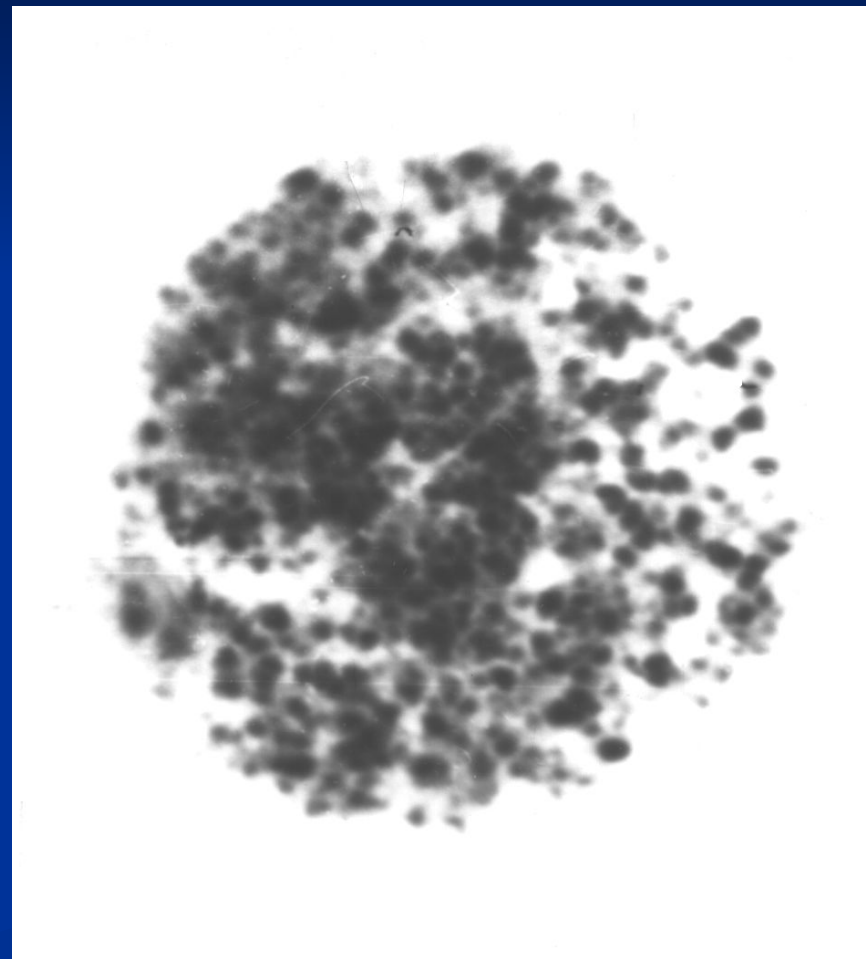
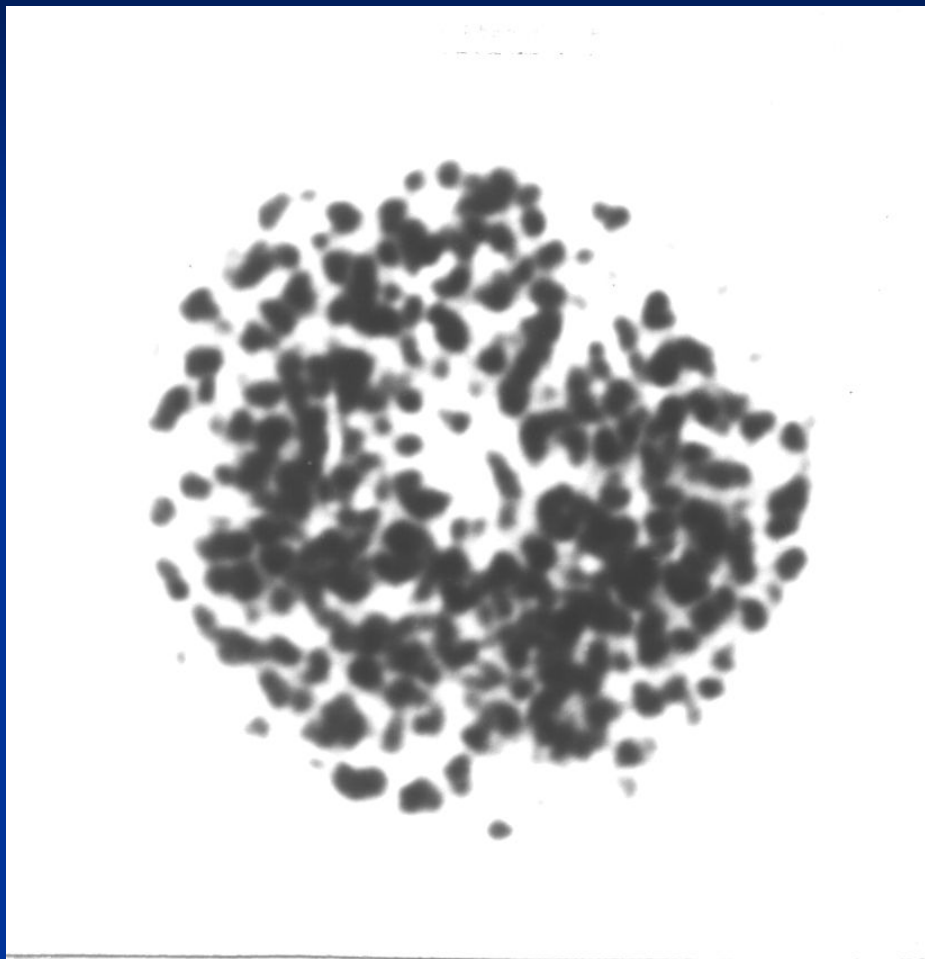
Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга (дозы 4-6 Гр)



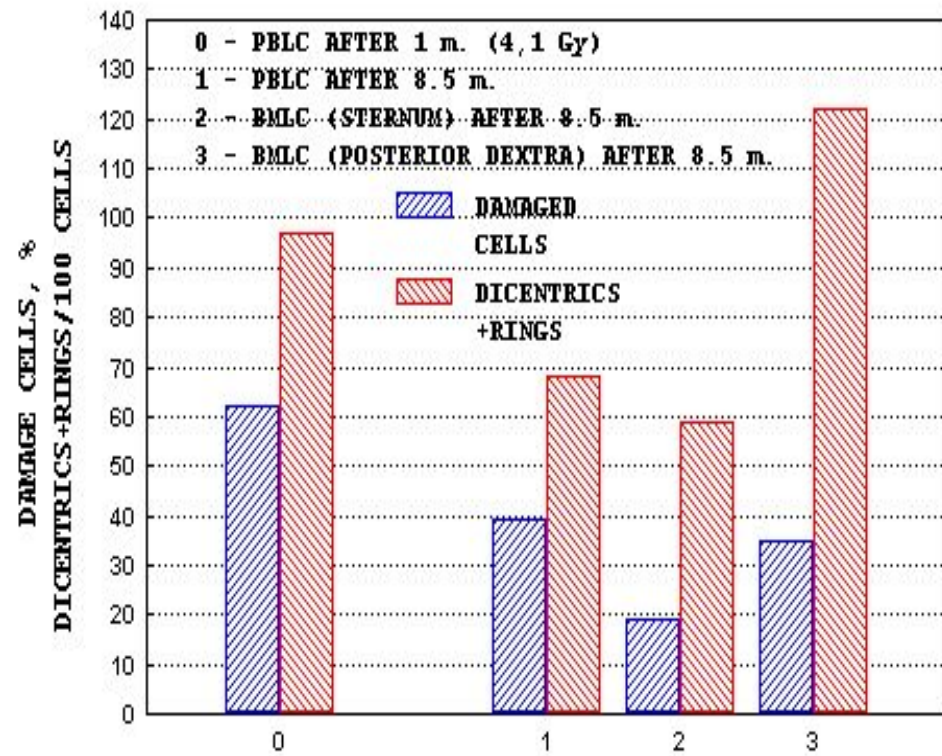
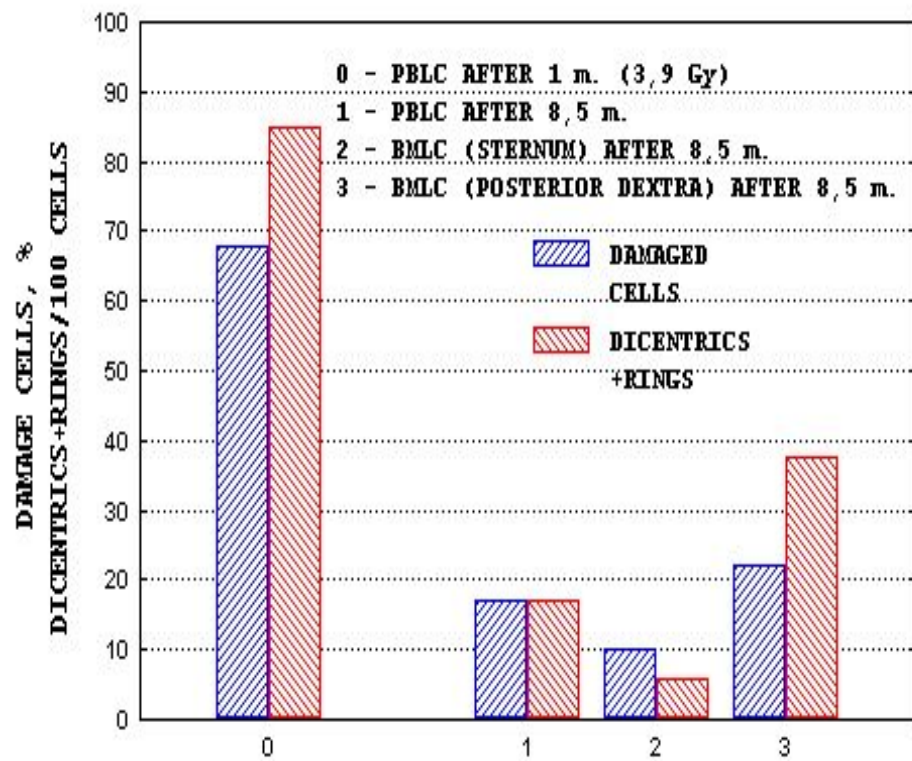
**Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга
(дозы 8-9 Гр)**



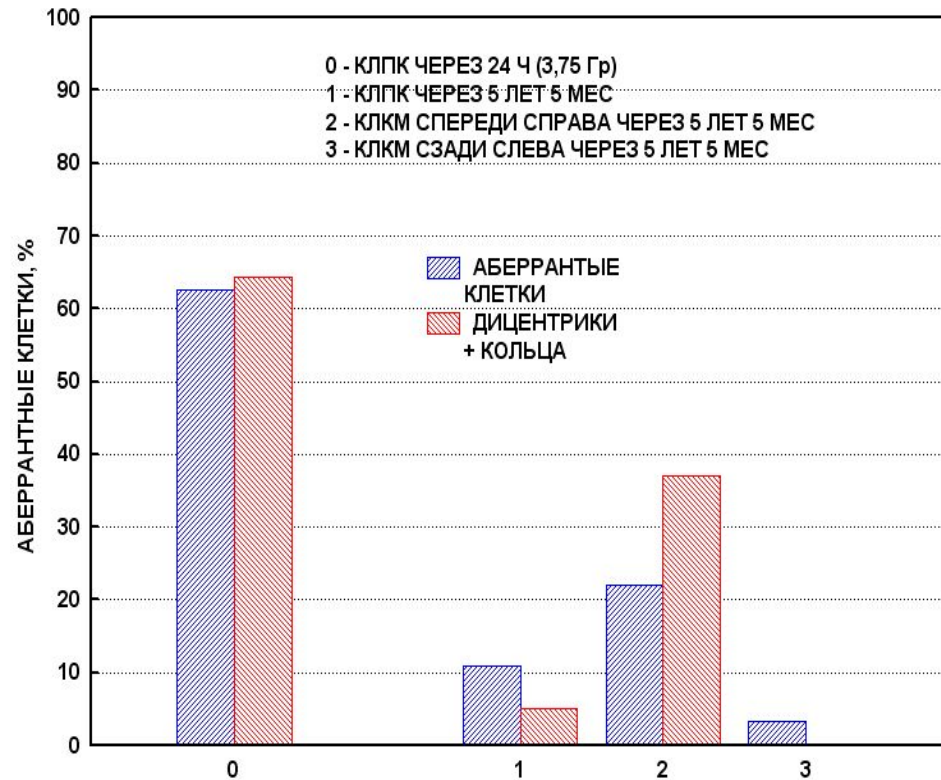
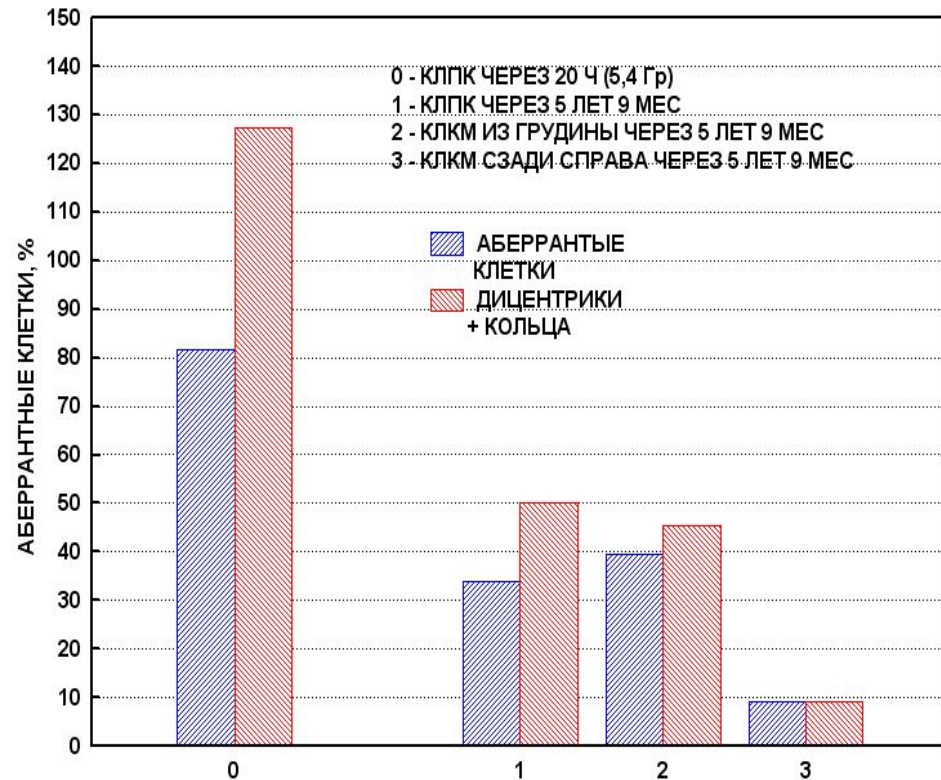
Аберрации хроматидного типа в клетках костного мозга (дозы больше 8-9 Гр)



НЕРАВНОМЕРНОЕ ОБЛУЧЕНИЕ: КУЛЬТУРЫ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА



НЕРАВНОМЕРНОЕ ОБЛУЧЕНИЕ: КУЛЬТУРЫ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА



Цитогенетическая оценка дозы: неравномерность облучения

- Таким образом, метод подсчёта аберрантных клеток в костном мозге позволяет оценивать дозы, полученные отдельными участками костного мозга, что важно для прогноза тяжести пострадиационного костномозгового синдрома. Однако он имеет существенные дозовые и временные ограничения.
- Анализ aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови менее связан этими параметрами. Он не требует коррекции на время, прошедшее после облучения, примерно в течение 1 месяца и позволяет оценивать дозы, по крайней мере, до 15 Гр гамма-излучения. Однако, даже если не учитывать чисто математические неопределённости метода компьютерного перевода распределений клеток по числу дицентриков в распределения лимфоцитов по дозе, серьёзные ошибки могут возникнуть, если распределение дозы по массе тела будет плохо отражать распределение дозы по красному костному мозгу.
- Определённый эффект могло бы дать некое объединение двух методик цитогенетического анализа в виде использования для оценки локальных доз на гемопоэтическую ткань *культур лимфоцитов* костного мозга, взятого из различных участков. Однако здесь возникает своя трудность, связанная с трудно устранимым разведением костного мозга кровью при его взятии, что приводит к завышению оцениваемой дозы на наименее поражённые участки и её занижению на облучённые в наибольшей дозе участки костного мозга. Это связано с наличием в культуре лимфоцитов как из костного мозга, так и из крови.
- Следовательно, имеющиеся преимущества и недостатки всех рассмотренных