

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРИРОДЫ НА ГЕНОМЫ

С. А. Рыжкин^{1,2,3} ✉, А. Б. Маргулис², Б. М. Куриненко²

¹ Казанская государственная медицинская академия (филиал РМАНПО), Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Казанский государственный медицинский университет, Казань

Пациенты и медицинский персонал регулярно подвергаются воздействию ионизирующих излучений (ИИ), которые могут быть причиной различных генетических нарушений в организме. В статье рассматриваются возможности тестов, используемых для интегральной оценки воздействия ИИ на генетический аппарат клетки: теста Эймса, микроядерного теста, метода FISH. Описываются примеры их использования, разбираются достоинства и недостатки каждого подхода, оцениваются перспективы разработки новых методов оценки и требования к ним.

Ключевые слова: генетическая токсикология, рентгеновское излучение, ионизирующее излучение, тест Эймса, микроядерный тест, метод FISH

Финансирование: статья подготовлена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Республики Татарстан (проект № 16-16-16018).

✉ **Для корреспонденции:** Рыжкин Сергей Александрович
ул. Бутлерова, д. 36, г. Казань, 420012; rsa777@inbox.ru

Статья получена: 10.04.2017 **Статья принята к печати:** 25.05.2017

METHODS OF GENETIC TOXICOLOGY IN THE ASSESSMENT OF GENOMIC DAMAGE INDUCED BY ELECTROMAGNETIC IONIZING RADIATION

Ryzhkin SA^{1,2,3} ✉, Margulis AB², Kurinenko BM²

¹ Kazan State Medical Academy (branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education), Kazan, Russia

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Medical or occupational exposure of patients and healthcare personnel to ionizing radiation (IR) can be a cause of genetic disorders. In this article we discuss the efficiency of the following tests used to comprehensively assess the effects of ionizing radiation on the genetic apparatus of a cell: the Ames test, the micronucleus test and the FISH method. We provide examples of their use, outline their advantages and drawbacks, estimate the possibility of designing more advanced test systems and discuss requirements for their implementation.

Keywords: genetic toxicology, X-ray radiation, ionizing radiation, gamma rays, test system, Ames test, micronucleus test, FISH

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Republic of Tatarstan (Project No. 16-16-16018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey Ryzhkin
ul. Butlerova, d. 36, Kazan, Russia, 420012; rsa777@inbox.ru

Received: 10.04.2017 **Accepted:** 25.05.2017

На геном живых организмов, в том числе ферменты, участвующие в синтезе и репарации ДНК, могут воздействовать как химические, так и физические факторы. Для оценки степени воздействия этих факторов используют одни и те же тесты, позволяющие в некоторых случаях определить мишень воздействия. Арсенал таких тест-систем разнообразен. В генетической токсикологии химических соединений тесты разделены на две группы. Тесты первой группы используют, как правило, для интегральной оценки генетической токсичности, проявляющейся мутациями или нарушением структуры ДНК. К тестам второй группы относят тесты, способные идентифицировать уникальную мишень воздействия, что позволяет предполагать механизм действия токсического агента.

Из физических факторов наибольшую значимость имеет ионизирующее излучение (ИИ) — излучение в виде

электромагнитных волн (гамма- и рентгеновское излучение) либо субатомных частиц (альфа-, бета-частиц, нейтронное излучение). ИИ, представленные электромагнитными волнами, в отличие от химических соединений ионизируют атомы молекул биологических объектов и среды в результате вторичных процессов, т. е. являются косвенно ионизирующими. Первичные процессы ионизации сопровождаются образованием свободных радикалов и перекиси водорода, которые и вступают в химические реакции с разнообразными молекулами биологической системы. Поэтому определить достоверно объект воздействия при лучевом повреждении генома организма невозможно. Однако с помощью анализа мутаций, стабильных и нестабильных хромосомных аберраций возможна интегральная оценка действия ИИ, совершенствование которой позволит выявлять индивидуальные особенности радиочувствительности

пациентов и персонала, выполняющего инвазивные вмешательства под контролем рентгеновского излучения. Это может быть использовано для планирования диагностики с применением современных дозообразующих технологий в лучевой диагностике и рентгеноэндоваскулярном лечении.

Тесты, используемые для интегральной оценки мутагенности ИИ

Тест Эймса

В тесте Эймса используются ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium*, которые под действием мутагенов способны ревертировать к прототрофности. В настоящее время тест Эймса усовершенствован: наряду с хорошо изученными мутациями, вызывающими потребность в гистидине, в геном сальмонеллы введена делеция по одному из генов репарации (*uvrB-bio*), что повышает чувствительность бактерий к мутагенам. Также в геном тест-штаммов введена мутация *rfa*, блокирующая синтез липополисахаридной капсулы, для повышения проницаемости клеток. Некоторые тест-штаммы *Salmonella typhimurium* несут плазмиду pKM 101, содержащую гены, повышающую чувствительность клеток к агентам, усиливающим рекомбинацию ДНК и индуцирующим SOS-мутагенез. Также благодаря данной плазмиде клетки тест-штаммов резистентны к ампициллину, что используется как маркер присутствия плазмиды [1].

В работе [2] тест Эймса использовали для оценки влияния на жизнеспособность и генотоксические эффекты облучения на рентгеновских компьютерных томографах в стандартных дозах от 4,4 до 74,5 мГр. Оценку мутагенности проводили на мутантном штамме *S. typhimurium TA 100 his G46, rfa, uvr-, pkm 101, bio*. В тесте на токсичность также использовали мутантный штамм *S. typhimurium TA 100*. О токсическом эффекте судили по выживанию тест-штамма в опытных (облученных) образцах по сравнению с контрольным. Было отмечено снижение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) приблизительно в 5 раз для облученных вариантов.

Используя эту же бактериальную модель (*S. typhimurium TA 100*), проведено сравнение токсического и мутагенного эффекта при моделировании трех различных рентгенодиагностических процедур на рентгеновских аппаратах [3]. Из приведенных данных следует, что рентгеновская диагностика за исключением процедур, выполняемых на цифровых малодозовых аппаратах, оказывает токсическое и слабое мутагенное воздействие в тесте Эймса.

Мы полагаем, что дальнейший поиск новых тест-объектов на токсичность и мутагенность в качестве модельной системы перспективен для оценки степени обеспечения радиационной безопасности используемых режимов и методов рентгенодиагностики.

Тесты, используемые для интегральной оценки воздействия ИИ, основанные на анализе количества стабильных и нестабильных аберраций хромосом

Нестабильные аберрации хромосом лимфоцитов. Микроядерный тест

Микроядерный тест на клетках периферической крови (эритроцитах, лимфоцитах, буккальных клетках) используют для обнаружения структурных изменений (аберраций) хромосом. Хромосомные аберрации возникают в резуль-

тате разрыва ДНК. Микроядра представляют собой небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом, лишенных центромера, или отставших на стадии ана-/телофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественные микроядра в цитоплазме клеток [4].

Петрашова и соавт. [5] исследовали образцы лимфоцитов периферической крови и буккального эпителия горняков, работающих под землей в условиях повышенной концентрации радона. Используя этот тест, авторы установили увеличение числа двуядерных лимфоцитов с микроядрами у горняков со стажем 20–40 лет в 1,6–1,7 раза по сравнению с горняками с меньшим стажем. Анализ клеток буккального эпителия показал, что в опытной группе почти в 2 раза больше клеток с кариолизисом и в 20 раз — двуядерных клеток по сравнению с группой контроля. Эти результаты могут свидетельствовать о воздействии ионизирующей радиации на процесс цитокинеза, нарушение которого может приводить к появлению многоядерных клеток.

Нестабильные аберрации хромосом лимфоцитов периферической крови (образование дицентриков, ацентрических фрагментов и центрических колец) используются для оценки действия ионизирующего излучения при рентгенологических обследованиях населения, а также при скрининговом обследовании людей, подвергшихся облучению [6]. Количественные данные о показателях нестабильных аберраций, так называемой «биологической» дозе, несут информацию не только о результате радиационного воздействия на организм человека, но и о его индивидуальной радиочувствительности. Это позволяет более точно оценивать возможные ранние и отдаленные последствия облучения. Даже при самых низких дозах ионизирующего излучения (1 мГр и менее) при проведении рентгенологических исследований органов грудной клетки, пищевода, желудка в лимфоцитах периферической крови обследуемых лиц регистрируется повышенный уровень аберраций хромосом [7]. Именно показатели «биологической» дозы при низких дозах облучения активно обсуждаются [8, 9]. Более высокий уровень хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови даже без клинических проявлений может свидетельствовать о развитии патологических процессов в организме человека.

Э. А. Демина [10] считает целесообразным при проведении скрининговых рентгенологических обследований отдельных контингентов населения для контроля лучевых нагрузок использовать методы биологической (цитогенетической) дозиметрии, для чего предлагается учитывать радиационно индуцированные аберрации хромосом после рентгенологического исследования в лимфоцитах периферической крови человека (*in vivo*) и *in vitro* — во флаконах с донорской кровью, размещенных в зонах риска пациента. При такой постановке контроля дозиметрическая информация будет получена путем моделирования условий облучения на тканеэквивалентном объекте. В своих исследованиях [11] авторы продемонстрировали эффективность такого моделирования при рентгенологическом обследовании органов грудной клетки и маммографии.

Идея постановки такого контроля представляется интересной, однако, на наш взгляд, она вызывает некоторые сомнения в плане снижения риска переоблучения. Во-первых, она ставится одновременно с рентгенологическим исследованием пациента. Данные, получаемые при параллельном облучении клеток крови, в том числе *in vitro*,

могут продемонстрировать превышение дозы (при условии наличия объективной калибровочной кривой «доза–эфф-эффект»), но пациент эту дозу уже получит. Во-вторых, контрольный образец лимфоцитов донорской крови *in vitro* может отличаться по радиочувствительности от организма облучаемого пациента (либо в сторону более высокой радиочувствительности, либо радиорезистентности). В-третьих, такой контроль рентгенодиагностической аппаратуры безусловно важен для оценки степени радиационной опасности рентгенологических обследований для пациентов. Однако мы полагаем, что для решения этой проблемы необходимы модели, обладающие стандартным ответом на облучение ИИ, и, кроме того, тестирование рентгенодиагностической аппаратуры для рентгенологических исследований должно проводиться с использованием этих моделей до обследования пациентов. Такой подход может обосновать не только необходимость снижения дозы облучения при сервисном техническом обслуживании рентгеновских аппаратов, но и разработку низкодозовых техник выполнения рентгенологических процедур, внедрение в практику технических решений по дальнейшей модернизации существующего парка рентгенодиагностической аппаратуры с целью снижения доз облучения пациентов и персонала.

Цитогенетические методы, основанные на анализе частоты нестабильных аберраций (дицентриков, ацентриков и центрических колец) используют для биологической индикации и дозиметрии ионизирующего излучения [12]. Подсчет частоты нестабильных аберраций лимфоцитов периферической крови, являющийся классическим методом, имеет целый ряд ограничений, однако несмотря на это используется для обследования людей, облученных ИИ.

Стабильные хромосомные аберрации в лимфоцитах крови. Метод FISH

К стабильным хромосомным аберрациям относятся симметричные транслокации, инсерции и инверсии. Их частота почти не меняется в течение длительного времени после облучения — месяцами, не редко годами. Во время клеточной пролиферации аберрации этого типа не элиминируются, клетки не погибают и, как следствие, сохраняются в процессе клеточного деления. Для анализа частоты транслокаций можно использовать метод G-дифференциального окрашивания. Для повышения его информативности анализируется каждая хромосома. Однако для этого требуется достаточно много времени и высокая квалификация специалистов даже при условии автоматического кариотипирования. Поэтому в настоящее время для анализа частоты транслокаций обычно используют метод FISH (fluorescent *in situ* hybridization). Принято считать, что метод FISH позволяет быстро и достоверно определять частоту аберраций и строить калибровочные кривые «доза–эффект» для симметричных транслокаций.

Анализ стабильных аберраций при обследовании пациентов, прошедших курс лучевой терапии, а также пострадавших в результате атомной бомбардировки в Хиросиме [13], позволил получить данные, которые свидетельствуют о длительных сроках сохранения стабильных транслокаций. Установлено, что у таких пациентов частота симметричных транслокаций составляет около 90–95 %, она не менялась в течение десятилетий и коррелирует с дозой облучения. Это дает основание использовать анализ транслокаций для ретроспективной оценки доз ионизирующего излучения.

Достоинства и недостатки тестов

Таким образом, в настоящее время для диагностики лучевого воздействия на биологические объекты, а применительно к человеку — и определения тяжести этого воздействия, используются все варианты интегральной оценки действия ИИ на геном и клетку. Однако ни один из них не является идеальным. Так, например, мутации, оцениваемые по изменению фенотипических признаков вида, могут свидетельствовать об изменениях в геноме только после закрепления этих изменений у потомков, на что требуется длительное время. Тем не менее этот метод применим к растениям и мелким животным. Нестабильные аберрации хромосом, в частности, микроядерный тест, неспецифичен, т. к. не только ИИ, но и различные токсиканты также вызывают образование микроядер. Хотя по факту перенесенного облучения количество микроядер может свидетельствовать о тяжести лучевого поражения. Нестабильные аберрации, оцениваемые по количеству дицентриков, ацентриков и центрических колец, также не лишены недостатков, которые мы обсуждали выше. Однако изменение их количества можно использовать после острого однократного и относительно равномерного радиационного воздействия в ранние сроки. Наиболее распространен метод оценки изменений стабильных аберраций. Основное его достоинство в длительности сохранения аберраций. Оба варианта методов оценки стабильных аберраций — метод G-дифференциального окрашивания хромосом и метод FISH — используются для определения стабильных аберраций. Однако методами дифференциальной окраски нельзя обнаружить дополнительные участки, присоединенные к хромосоме, отсутствие какого-либо участка или его неправильное расположение, если длина участка меньше 3–5 % длины хромосомы [14]. Кроме того, метод трудоемок и требует высокой квалификации исполнителя. Метод FISH широко используется, обладает высокой разрешающей способностью, но трудоемок, требует специального оборудования и реактивов.

Актуальность использования методов генетической токсикологии для планирования лучевой диагностики и рентгеноэндovasкулярного лечения с применением современных дозообразующих технологий

На наш взгляд, следует отметить несколько важных моментов, связанных с использованием рентгеновского излучения в медицинской диагностике. Количество выполняемых медицинских рентгенологических процедур увеличивается [15], средние индивидуальные и коллективные дозы облучения населения при проверочной флюорографии, рентгенографических и рентгеноскопических процедурах чуть снизились [16]. Ранее мы отмечали, что внимания заслуживает организация мер радиационной безопасности в области инвазивных процедур, осуществляемых под контролем лучевых методов визуализации [17], а также доминирование компьютерной томографии (КТ) в формировании годовой коллективной эффективной дозы медицинского облучения [18].

Действительно, рентгеноэндovasкулярные методы диагностики и лечения показали свою высокую клиническую эффективность, однако дозы облучения пациентов при этом значительные [15]. То же самое касается КТ-процедур [18]. В работе [19] показано, что дозовая зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК характеризовалась повышением эффекта

в диапазоне 12–32 мГр. Подобный эффект отмечали и в других исследованиях влияния ионизирующего излучения, в том числе рентгеновского, в близких диапазонах доз [19]. Целый ряд КТ-процедур характеризуется такими дозами облучения. В этом контексте актуальным и перспективным направлением является разработка и совершенствование методов интегральной оценки действия ИИ на геном клеток критически важных органов пациента при облучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходима разработка новых методов интегральной оценки действия ИИ электромагнитной природы, в том числе рентгеновского излучения, на геном клеток облучаемых

органов человека, которые бы позволили точно определять индивидуальные особенности радиочувствительности пациентов и персонала, выполняющего инвазивные вмешательства под контролем рентгеновского излучения, и могли быть использованы для безопасной диагностики различных заболеваний. Требования к таким методам определяются объектом и задачами исследования. Важно, чтобы они были доступными, требовали небольших затрат труда, времени и денег. К сожалению, пока метода, учитывающего все перечисленные требования, нет. Однако продолжать поиск в этом направлении, на наш взгляд, следует. Такие методы могли бы стать основой тест-систем, используемых в сервисном контроле технического состояния так называемой «тяжелой» техники для лучевой диагностики и рентгенэндоваскулярного лечения.

Литература

- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2010 Nov 20; 455 (1–2): 29–60.
- Маргулис А. Б., Рыжкин С. А., Слесарева А. Н., Белоногова Н. В., Пономарев В. Я., Ильинская О. Н. Генотоксические эффекты облучения на рентгено-компьютерных томографах. *Вестник Казанского технологического университета.* 2014; 17 (14): 380–2.
- Ryzhkin SA, Margulis AB, Belonogova NV, Ilinskaya ON. Comparative study of the X-ray diagnostic procedures safety using bacterial test-systems. In: Badalyan H, editor. *Proceedings of International workshop 'Ionizing and non-ionizing radiation influence on structure and biophysical properties of living cells'*; 2015 Sep 25–27; Tsakhkadzor, Armenia. *Armenian Journal of Physics.* 2016; 9 (1).
- Adler ID. Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt S, Parry JM, editors. *Mutagenicity testing: practical approach.* Oxford: IRL Press; 1984. p. 275–306.
- Петрашова Д. А., Пожарская В. В., Белишева Н. К. Генотоксические эффекты природных источников ионизирующей радиации в лимфоцитах периферической крови и букальном эпителии горных рабочих. В сб.: VII съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозология, радиационная безопасность); 21–24 октября 2014 г.; Москва. М.: Изд-во РУДН; 2014. С. 84.
- Bonassi S, Kirsh-Volders M, Stromberg U, Vermuelen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers; review of literature and future prospectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005 Mar–Apr; 45 (2–3): 258–70. DOI: 10.1002/em.20115.
- Ставицкий Р. В., редактор. *Медицинская рентгенология: технические аспекты, клинические материалы, радиационная безопасность.* М.: МНПИ; 2003. 344 с.
- Бурлакова Е. Б. Эффект сверхмалых доз. *Вестник РАН.* 1994; 64 (5): 425.
- Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects - implications for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb; 4 (2): 158–64. DOI: 10.1038/nrc1277.
- Дёмина Э. А. Медицинские рентгенологические исследования и канцерогенные эффекты. *Проблемы радиационной медицины та радіобіології.* 2014; 19: 35–47.
- Domina EA. The radiobiological aspects of screening mammography: a reminder about possible distant negative effects. В сб.: *Международная конференция «Радиобиологические и радиозоологические аспекты Чернобыльской катастрофы»*; 11–15 апреля 2011 г.; Славутич, Украина. Славутич: Фітосоціоцентр; 2011. С. 28.
- Хвостунов И. К., Шепель Н. Н., Севаньяев А. В., Нугис В. Ю., Коровчук О. Н., Курсова Л. В. и др. Совершенствование методов биологической дозиметрии путем анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при облучении in vitro и in vivo. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* 2013; 1 (9): 135–47.
- Снигирева Г. П. Биологическая дозиметрия на основе цитогенетического анализа. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии.* 2011; (11) [Интернет]. [протитировано: апрель 2017 г.] Доступно по ссылке: http://vestnik.mcrr.ru/vestnik/v11/papers/snigir2_v11.htm
- Колубаева С. Н. Использование цитогенетических методов в радиационной медицине. *Вестник Российской Военно-медицинской Академии.* 2008; 3 (23 Приложение 1): 179.
- Мозерова Е. Я. Новые источники малых доз радиации: результаты развития диагностической и терапевтической радиологии. *Радиационная гигиена.* 2012; 5 (2): 71–4.
- Рыжкин С. А., Иванов С. И., Пяташина М. А., Исмагилов Р. К., Аюпова Н. А., Логинова С. В. и др. Современные особенности формирования уровней медицинского облучения населения Республики Татарстан при выполнении рентгенологических процедур. *Радиационная гигиена.* 2015; 8 (1): 45–54.
- Рыжкин С. А., Шарафутдинов Б. М., Михайлов М. К. Опыт использования усовершенствованных методик при рентгенэндоваскулярных вмешательствах с целью снижения лучевых нагрузок на пациентов. *Вестник рентгенологии и радиологии.* 2017; 98 (1): 30–5.
- Валентин Д., редактор. *Радиационная защита в медицине.* СПб.: НИИ радиационной гигиены им. проф. П. В. Рамзаева; 2011. 66 с. Доступно по ссылке: <http://www.icrp.org/docs/P105Russian.pdf>
- Васильев С. А., Степанова Е. Ю., Кутенков О. П., Беленко А. А., Жаркова Л. П., Большаков М. А. и др. Двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах человека после однократного воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в малых дозах: нелинейная дозовая зависимость. *Радиационная биология. Радиозология.* 2012; 52 (1): 31–8.
- Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2014; 17 (14): 380–2. Russian.
- Ryzhkin SA, Margulis AB, Belonogova NV, Ilinskaya ON. Comparative study of the X-ray diagnostic procedures safety using bacterial test-systems. In: Badalyan H, editor. *Proceedings*

References

- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2010 Nov 20; 455 (1–2): 29–60.
- Margulis AB, Ryzhkin SA, Slesareva AN, Belonogova NV, Ponomarev VYa, Ilinskaya ON. Genotoksicheskiye efekty oblucheniya na rentgeno-komp'yuternykh tomografakh. *Vestnik*