

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE RUSSIAN FEDERATION
ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО (ФМБА РОССИИ)
FEDERAL MEDICAL BIOLOGICAL AGENCY (THE FMBA OF RUSSIA)

МЕДИЦИНСКАЯ РАДИОЛОГИЯ

И

РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

MEDICAL RADIOLOGY AND RADIATION SAFETY

Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost

2020

Том 65

№ 5

Периодический научный журнал. Издаётся с 1956 года
Periodical Scientific Journal. Published since 1956

Журнал включен в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов,
рекомендованных для опубликования результатов диссертационных исследований.
The journal is included in the list of HAC (Higher Attestation Commission) of the leading
peer-reviewed scientific journals recommended for publication of the results of thesis works

Журнал вошел в международную библиографическую базу данных Scopus
и в Перечень Russian Science Citation Index (RSCI), размещенный на платформе Web of Science
The journal entered the bibliographic database Scopus
and the Russian Science Citation Index (RSCI), hosted on the Web of Science platform

Москва
Moscow

МЕДИЦИНСКАЯ РАДИОЛОГИЯ И РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Журнал основан в январе 1956 года
(до 30 декабря 1993 года выходил под названием «Медицинская радиология»)
Периодичность издания: шесть выпусков в год

ISSN 1024-6177 (Print)
ISSN 2618-9615 (Online)

Учредители:

Российская академия наук
Министерство здравоохранения Российской Федерации
Журнал выходит при поддержке Федерального медико-биологического агентства России (ФМБА России)

Редакционная коллегия:

Г.М. Аветисов – д.б.н., проф.; И.И. Амосов – д.м.н., проф.; А.В. Бойко – д.м.н., проф.; А.П. Бирюков – д.м.н., проф.;
А.Ю. Бушманов – д.м.н., проф.; А.А. Вайнсон – д.б.н., проф.; В.Ф. Демин – д.т.н., к.ф.-м.н., доцент;
И.П. Коренков – д.б.н., к.т.н., проф.; А.Н. Котеров – д.б.н.; М. Марков – PhD, проф., США;
Б.Я. Наркевич – д.т.н., к.ф.-м.н., проф., научный и выпускающий редактор; К. Нурлыбаев – к.т.н.; В.В. Романов;
А.С. Самойлов – д.м.н., проф., член-корр. РАН, зам. главного редактора; М.К. Сневе – PhD, Норвегия;
С.И. Ткачев – д.м.н., проф.; И.Е. Тюрин – д.м.н., проф.; П. Урингтон – PhD, проф., США; Б.Н. Фаунтес – PhD, США;
Н.К. Шандала – д.м.н.; А.В. Шафиркин – д.б.н.; С.М. Шинкарев – д.т.н.

Редакционный совет:

С.С. Алексанин – д.м.н., проф., Санкт-Петербург; М.И. Балонов – д.б.н., проф., Санкт-Петербург;
А.Х. Гонзалес – академик, представитель НКДАР ООН, член МАГАТЭ, Аргентина; М.В. Забелин – д.м.н., проф.;
В.К. Иванов – д.т.н., проф., член-корр. РАН, Обнинск; Л.А. Ильин – д.м.н., проф., академик РАН;
П.К. Казымбет – д.м.н., проф., Казахстан; Н.М. Оганесян – д.м.н., проф., Армения;
М. Пинак – член МАГАТЭ; А.В. Рожко – д.м.н., доцент, Белоруссия; В.А. Саенко – д.б.н., ассоциированный проф., Япония

Заведующая редакцией Э.С. Зубенкова
Компьютерная верстка В.В. Колесниченко
Технический редактор В.В. Колесниченко

Адрес редакции журнала:

123098, Москва, ул. Живописная, 46
Телефон: (499) 190-95-51

E-mail: medradiol@fmbcfmba.ru
Сайт журнала: <http://medradiol.fmbafmba.ru/>
Годовой подписной индекс Агентства «Роспечать» – 71814
Подписано в печать 11.12.2020. Формат 60 × 88/8
Печать офсетная. 11,5 печ. л. Тираж 1000 экз. Заказ №
Отпечатано в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА
России. 123098, Москва, ул. Живописная, 46

MEDICAL RADIOLOGY AND RADIATION SAFETY

The journal was founded in January 1956
Up to 30 December 1993 was published under the title «Medical Radiology»
Frequency of publication: six issues per year

ISSN 1024-6177 (Print)
ISSN 2618-9615 (Online)

Founders:

Russian Academy of Sciences
Ministry of Healthcare of the Russian Federation
The journal is published with support of The Federal Medical-Biological Agency of Russia FMBA of Russia

Editorial Board:

G. M. Avetisov – Dr. Sci. Biol., Prof.; V. I. Amosov – Dr. Sci. Med., Prof.; A. V. Boiko – Dr. Sci. Med., Prof.;
A. P. Biryukov – Dr. Sci. Med., Prof.; A. Yu. Bushmanov – Dr. Sci. Med., Prof.; A. A. Wainson – Dr. Sci. Biol., Prof.;
V. F. Demin – Dr. Sci. Tech., Cand. Sci. Phys.-Math., Assistant Prof.; I. P. Korenkov – Dr. Sci. Biol., PhD Tech., Prof.;
A. N. Kotterov – Dr. Sci. Biol.; M. Markov – Prof., USA; B. Ya. Narkevich – Dr. Sci. Tech., PhD Phys.-Math., Prof., Scientific
and Production Editor; K. N. Nurlybaev – PhD Tech.; V. V. Romanov; A. S. Samoylov – Dr. Sci. Med., Prof., Corresponding Member
of RAS, Deputy Chief Editor; M. K. Sneve – Norway; S. I. Tkachev – Dr. Sci. Med., Prof.; I. E. Tyurin – Dr. Sci. Med., Prof.;
P. Wrington USA; B. N. Fountas – USA; N. K. Shandala – Dr. Sci. Med.; A. V. Shafirkin – Dr. Sci. Biol.; S. M. Shinkarev – Dr. Sci. Tech.

Editorial Council:

S. S. Aleksanin – Dr. Sci. Med., Prof.; M. I. Balonov – Dr. Sci. Biol., Prof.; A. J. Gonzalez – Academician, Member of the IAEA;
M. V. Zabelin – Dr. Sci. Med., Prof.; V. K. Ivanov – Dr. Sci. Tech., Prof., Chairman of the Russian Scientific Commission on
Radiological Protection, Corresponding Member of RAS; L. A. Il'yin – Dr. Sci. Med., Prof., Academician of RAS;
P. K. Kazymbet – Dr. Sci. Med., Prof., Kazakhstan; N. M. Oganessian – Dr. Sci. Med., Prof., Armenia;
M. Pinak – Member of the IAEA; A. V. Rozhko – Dr. Sci. Med., Associate Prof., Belarus;
V. A. Saenko – Dr. Sci. Biol., Associate Prof., Japan

Head of Editorial Office: E. S. Zubenkova
Computer-aided makeup: V. V. Kolesnichenko
Technical Editor: V. V. Kolesnichenko

Address of Editorial Board:

46, Zhivopisnaya st., 123098, Moscow, Russia
Phone: +7 (499) 190-95-51

E-mail: medradiol@fmbcfmba.ru
The journal website: <http://medradiol.fmbafmba.ru/>
The annual subscription index Agency «Rospechat» – 71814
Signed to print 11.12.2020. Format 60 × 88/8
Offset printing. 11,5 printed sheets. 1000 copies. Order #
Printed by SRC-FMBC.
123098, Moscow, Zhivopisnaya st. 46

СОДЕРЖАНИЕ № 5 – 2020

РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ	5 Оценка эффекта радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе на цитосовместимость децеллюляризованных сосудистых матриксов В.А. Брумберг, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, Т.Ф. Маливанова, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, С.В. Лищук, А.М. Борбат, Е.А. Дубова, А.Е. Махова, Т.В. Карасёва, Е.И. Добровольская, Е.Е. Ломоносова, М.А. Таратоненкова, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов 12 Трёхцветный FISH-метод: кривые доза-эффект для транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови после гамма-облучения <i>in vitro</i> В.Ю. Нугис, Г.П. Снигирёва, Е.Е. Ломоносова, М.Г. Козлова, В.А. Никитина
РАДИАЦИОННАЯ МЕДИЦИНА	21 Диагностика хронического лучевого синдрома на ранней стадии А.В. Аклев 29 Роль метилирования <i>Bak1</i> в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении О.С. Цымбал, Д.С. Исубакова, Е.В. Брониовская, И.В. Мильто, М.В. Халюзова, Н.В. Литвяков, Р.М. Тахауов
РАДИАЦИОННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	35 Прогноз смертности в когорте российских участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС А.И. Горский, М.А. Максюттов, К.А. Туманов, Е.В. Кочергина, Н.С. Зеленская, В.К. Иванов
ЛУЧЕВАЯ ДИАГНОСТИКА	42 Компьютерно-томографическая кавернозография — метод предоперационной подготовки пациентов к фаллоэндопротезированию П.С. Кызласов, А.Т. Мустафаев, А.Н. Башков, Ю.Д. Удалов, Т.М. Топузов, А.Г. Мартов 45 Возможности компьютерной томографии в диагностике атероклеротического поражения магистральных сосудов при сахарном диабете второго типа и других нарушениях углеводного обмена Е.А. Праскурничий, Е.А. Ионова, И.И. Безунова, А.Н. Князев
ЯДЕРНАЯ МЕДИЦИНА	51 Результаты доклинических исследований безопасности радиофармпрепарата с ^{90}Y для внутриартериальной радиоэмболизации злокачественных новообразований печени О.Е. Клементьева, О.П. Власова, Д.В. Степченко, К.А. Лунёва, К.Э. Терновская, В.М. Петриев, Е.Д. Степченкова, А.А. Кузнецов, С.А. Артамонов, К.А. Мурашин, П.В. Шегай, С.А. Иванов, А.Д. Каприн 60 Результаты доклинических испытаний эффективности радиофармпрепарата «ДТПА-микросферы альбумина, ^{90}Y» О.П. Власова, Е.Д. Степченкова, В.М. Петриев, О.Е. Клементьева, Д.В. Степченко, А.С. Краснопорова, А.А. Кузнецов, Н.А. Нерозин, С.А. Иванов, А.Д. Каприн
НЕИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ	68 Лазерные и радиоволновые технологии в дерматовенерологии и косметологии Е.В. Липова, М.Р. Рахматулина, И.И. Глазко, А.С. Чекмарев
РАДИАЦИОННАЯ ФИЗИКА, ТЕХНИКА И ДОЗИМЕТРИЯ	77 Modeling of Laboratory Animals Exposure Conditions behind Local Concrete Shielding Bombarded by 650-MeV Protons А.А. Ivanov, [А.Р. Krylov], А.Г. Molokanov, А.Yu. Bushmanov, А.С. Samoylov, Е.Е. Pavlik, G.V. Mytsin, S.V. Shvidky, G.N. Timoshenko
ДИСКУССИЯ	87 Сравнительный анализ правового регулирования ядерной и геномной медицины А.С. Самойлов, Е.В. Голобородько, Т.А. Астрелина, Е.В. Дедова, И.В. Чуковская, Т.В. Губаева

CONTENTS No. 5 – 2020

RADIATION BIOLOGY	5 Evaluation of Ultrahigh Dose Irradiation Sterilization Influence on Cytocompatibility of Decellularized Vascular Scaffolds V.A. Brumberg, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, T.F. Malivanova, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brunchukov, A.A. Rastorgueva, S.V. Lischuk, A.M. Borbat, E.A. Dubova, M.L. Ganzhelyuk, A.E. Makhova, T.V. Karaseva, E.I. Dobrovolskaya, E.E. Lomonosova, M.A. Taratonenkova, A.Yu. Bushmanov, A.S. Samoilov 12 Three-Color FISH Method: Dose–Effect Curves for Translocations in Peripheral Blood Lymphocyte Cultures after Gamma-Irradiation in vitro V.Yu. Nugis, G.P. Snigiryova, E.E. Lomonosova, M.G. Kozlova, V.A. Nikitina
RADIATION MEDICINE	21 Diagnosis of Chronic Radiation Syndrome at the Early Stage A.V. Akleyev 29 The Role of Bak1 Methylation in the Induction of Chromosomal Aberrations under Chronic Low-Intensity External Radiation O.S. Tsymbal, D.S. Isubakova, E.V. Bronikovskaya, I.V. Milto, M.V. Khalyuzova, N.V. Litviakov, R.M. Takhauov
RADIATION EPIDEMIOLOGY	35 Prognostic Analysis of Mortality in the Cohort of the Chernobyl Cleanup Workers A.I. Gorski, M.A. Maksoutov, K.A. Tumanov, E.V. Kochergina, N.S. Zelenskaya, V.K. Ivanov
DIAGNOSTIC RADIOLOGY	42 Computed Tomographic Cavernosography Is a Method of Preoperative Preparation of Patients for Penile Implant P.S. Kyzlasov, A.T. Mustafaev, A.N. Bashkov, Y.D. Udalov, T.M. Topuzov, A.G. Martov 45 Possibilities of Multislice Computed Tomography in the Diagnosis of Atherosclerotic Lesions of the Main Vessels for Type 2 Diabetes and Other Variants Disorders of Carbohydrate Metabolism E.A. Praskurnichiy, E.A. Ionova, I.I. Begunova, A.N. Knyazev
NUCLEAR MEDICINE	51 Results of Preclinical Safety Tests of Radiopharmaceutical with ^{90}Y for Intra-Arterial Radioembolization of Liver Cancer O.E. Klementyeva, O.P. Vlasova, D.V. Stepchenkov, K.A. Lunyova, K.E. Ternovskaya, V.M. Petriev, E.D. Stepchenkova, A.A. Kuznetsov, S.A. Artamonov, K.A. Murashin, P.V. Shegai, S.A. Ivanov, A.D. Kaprin 60 The Preclinical Test's Results of the Efficiency of the Radiopharmaceutical Preparation "DTPA-Microspheres of Albumin, ^{90}Y" O.P. Vlasova, E.D. Stepchenkova, V.M. Petriev, O.E. Klementyeva, D.V. Stepchenkov, A.S. Krasnoperova, A.A. Kuznetsov, N.A. Nerozin, S.A. Ivanov, A.D. Kaprin
NON-IONIZING RADIATION	68 Laser and Radiowave Technologies in Dermatovenereology and Cosmetology E.V. Lipova, M.R. Rakhmatulina, I.I. Glazko, A.S. Chekmarev
RADIATION PHYSICS, TECHNOLOGY AND DOSIMETRY	77 Modeling of Laboratory Animals Exposure Conditions behind Local Concrete Shielding Bombarded by 650-MeV Protons A.A. Ivanov, A.R. Krylov, A.G. Molokanov, A.Yu. Bushmanov, A.S. Samoylov, E.E. Pavlik, G.V. Mytsin, S.V. Shvidky, G.N. Timoshenko
DISCUSSION	87 Comparative Analysis of Legal Regulation of Nuclear and Genomic Medicine A.S. Samoylov, E.V. Goloborodko, T.A. Astrelina, E.V. Dedova, I.V. Chukovskaya, T.V. Gubaeva

В.А. Брумберг, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, Т.Ф. Маливанова, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, С.В. Лишук, А.М. Борбат, Е.А. Дубова, А.Е. Махова, Т.В. Карасёва, Е.И. Добровольская, Е.Е. Ломоносова, М.А. Таратоненкова, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ В СВЕРХВЫСОКОЙ ДОЗЕ НА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ СОСУДИСТЫХ МАТРИКСОВ

Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России

Контактное лицо: Татьяна Алексеевна Астрелина, t_astrelina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучить эффект радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе 30 кГр на цитосовместимость децеллюляризованных сосудистых матриксов, заселенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) плаценты.

Материал и методы: Материалом исследования явились аорты лабораторных животных (кроликов и крыс, по три сосуда для животного каждого вида), которые подвергались детергентно-ферментативной перфузионной децеллюляризации по двум протоколам, отличающимся составом реагентов. Далее матрикс, децеллюляризованный по наиболее эффективному протоколу, облучали в дозе 30 кГр и заселяли МСК плаценты человека. В качестве контроля необлученный матрикс заселяли клетками того же типа. Для оценки эффективности децеллюляризации и заселения использовали гистологическую окраску гематоксилином-эозином, ИГХ на коллаген I типа и Ki67, окраску DAPI и количественную оценку содержания геномной ДНК. Оценку заселения матриксов проводили с помощью анализа серийных срезов, взятых на 1-е, 3-е и 4-е сут культивирования.

Результаты: Матриксы, полученные в соответствии с протоколом 1, характеризовались отсутствием определяемых ядер клеток, при этом содержание ДНК в них было достоверно ниже по сравнению с протоколом 2. На оцифрованных изображениях срезов необлученного матрикса ядра клеток определялись при окрашивании гематоксилином-эозином и DAPI, а в облученном матриксе были визуализированы ядра клеток на границе между матриксом и фибриновым гелем только при окраске DAPI на 1-е сут культивирования. Частота встречаемости Ki67+ ядер на 4-е сут культивирования была достоверно ниже в облученном матриксе по сравнению с необлученным матриксом (7,5% и 29,8% соответственно; $p = 0,0054$).

Заключение: Облучение матриксов с целью радиационной стерилизации приводит к потере цитосовместимости тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: *сосудистый матрикс, фибриновый гель, статичное заселение, сверхвысокие дозы, радиационная стерилизация, тканевая инженерия, регенеративная медицина*

Для цитирования: Брумберг В.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Маливанова Т.Ф., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Лишук С.В., Борбат А.М., Дубова Е.А., Махова А.Е., Карасёва Т.В., Добровольская Е.И., Ломоносова Е.Е., Таратоненкова М.А., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С. Оценка эффекта радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе на цитосовместимость децеллюляризованных сосудистых матриксов. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):5-11.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-5-11

Введение

В настоящее время в области тканевой инженерии существуют различные способы совмещения носителя (матрикса) с мезенхимальными стволовыми или зрелыми дифференцированными клетками [1]. Динамические способы заселения (вакуумизация, центрифугирование, низкоскоростная перфузия) применимы в основном к синтетическим или композитным матриксам ввиду наличия крупных пор и низкого гидродинамического сопротивления. Статичный способ доставки клеточной суспензии к поверхности матрикса характеризуется низкой эффективностью заселения (не более 10–25%) [1]. Эффективность статичного заселения матрикса может быть повышена за счёт покрытия его поверхности биоактивными молекулами [2].

Основными критериями оценки качества матриксов и тканеинженерных конструкций является безопасность и биосовместимость. Известно, что радиационная стерилизация в сверхвысоких дозах 25–30 кГр используется как метод терминальной стерилизации медицинских изделий, в том числе бесклеточных матриксов [3]. Однако γ -облучение в подобных дозах может оказывать негативный эффект на цитосовместимость, адгезивные свойства матрикса и структурную целостность.

Целью настоящего исследования являлось изучение эффекта радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе 30 кГр на цитосовместимость децеллюляризованных заселенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) сосудистых матриксов.

Материал и методы

Для получения материала исследования использовали лабораторных животных, полученных из специализированного питомника «Пушино», имеющих соответствующее ветеринарное свидетельство (самцов крыс линии Wistar массой тела до 200 г, прошедших 14-суточный карантин; кроликов породы «Советская шиншилла» с массой тела 3,5 кг, прошедших 21-суточный карантин). Изъятие крысиной аорты осуществляли под общим наркозом при внутримышечном введении препарата «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозе 0,1 мг/кг массы тела животного. Изъятия аорты кролика осуществляли под общим внутривенным наркозом 1% водной эмульсии пропофола из расчёта на 7,5 мг/кг массы тела. Всего в исследовании было использовано 6 животных (по 3 каждого вида) и выделено 6 сосудов. Исследование осуществлялось в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических экспериментов в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96

и 51000.4-96) и с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

После изъятия сосуда помещали в стерильные пакеты, заполненные физиологическим раствором с добавлением пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и амфотерицина В (Bharat Serums & Vaccines, Индия). Аорты лабораторных животных хранили при температуре +4 °С в физиологическом растворе с добавлением пенициллина-стрептомицина.

Детергентно-ферментативная перфузионная децеллюляризация

Для обеспечения перфузии аорту кролика фиксировали в статичной трубчатой стеклянной камере (Ebers Medical, Испания) и помещали в проточный биореактор Ebers TEB500 (Ebers Medical, Испания). Для фиксации аорты крысы проксимальный конец сосуда закрепляли на периферическом венозном катетере 26G VasoFix (Braun, Германия) с помощью шовного материала Prolene 4-0.

Детергентно-ферментативную децеллюляризацию проводили по протоколам 1 и 2, для каждого вида животных (кролика и крысы). Соответственно, всего было получено 4 децеллюляризованных матрикса аорты, по одной аорте кролика и крысы не подвергались децеллюляризации и были использованы в качестве контролей (нативные сосуды). Протоколы 1 и 2 отличались составом детергентов.

Протокол 1:

- (1) перфузия 0,5% Тритон X100 (Santa-Cruz, США), 0,5% деоксихолат натрия (NaDOC) (Sigma-Aldrich) проводилась в течение 2 сут;
- (2) 0,05% Трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания) в течение 2 ч;
- (3) DMEM с низкой глюкозой (Biological Industries, Израиль) с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (конечная концентрация 10%) с пенициллином в течение 24 ч;
- (4) раствор 300 ЕД/мл ДНКазы I (AppliChem, Германия) с добавлением 2,5 ЕД/мл липазы (Renco, Новая Зеландия) в течение ночи;
- (5) PBS (фосфатный буфер, Sigma-Aldrich) с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут.

Протокол 2:

- (1) PBS с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут;
- (2) гипотоническая среда 10 ммоль Трис-HCl (Santa-Cruz, США) pH 8,0 — в течение 48 ч;
- (3) гипертоническая среда — 10 ммоль Трис-HCl, 500 mM KCl (Sigma Aldrich), 1% Тритон X100 в течение 48 ч;
- (4) 0,75% SDS (Santa-Cruz, США), 10 ммоль Трис-HCl в течение ночи;
- (5) 540 ЕД/мл ДНКазы I в течение 5 ч;
- (6) PBS с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут.

Оценка эффективности децеллюляризации матриксов

Для оценки остаточного количества геномной ДНК из фрагментов нативных сосудов и децеллюляризованных матриксов выделяли ДНК с использованием коммерческого набора Genomic DNA Extraction

Kit (Thermo Fisher, США). Исследование проводили в триплетах. Концентрацию ДНК в полученных препаратах определяли на спектрофотометре SmartSpec (BioRad, США). Значения пересчитывали как концентрацию ДНК в образце ткани (нг/мг ткани).

Для оценки качества децеллюляризации матриксов использовали следующие методы: гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином-эозином для выявления остаточных ядер клеток; иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с антителами к коллагену I типа внеклеточного матрикса (моноклональные антитела к коллагену I типа крысы и кролика (Dako, Дания); окрашивание DAPI (MetaSystems Probes, Германия).

Первичный анализ изображения проводили с использованием прямого микроскопа Carl Zeiss Axiovert Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$ и $\times 100$. Сканированные изображения препаратов в высоком разрешении получали при увеличении $\times 20$ с использованием сканера гистологических стёкол Ventana iScan HT (Roche Diagnostics, Швейцария). Дальнейший анализ отсканированных изображений выполняли с использованием программного обеспечения QuPath 0.2.0 Quantitative Pathology & Bioimage Analysis. Критерием эффективности децеллюляризации в данном случае являлось отсутствие морфологически различимых ядер в видимом поле зрения, не регистрируемых алгоритмами детекции ПО QuPath [4, 5].

Облучение децеллюляризованного матрикса

Проводили облучение децеллюляризованных матриксов аорты в сверхвысокой дозе 30 кГр в течение 40 мин на установке УЭЛР — 10.0-100-T-100 (Россия) с номинальной энергией тормозного излучения 7,6 МэВ и частотой 25 Гц.

Заселение децеллюляризованных матриксов

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) плаценты человека были получены при культивировании до 3-го пассажа по стандартной методике [6].

Облучённый матрикс аорты кролика площадью 6,28 см² заселяли МСК в количестве 1 млн. 1/3 часть МСК смешивали с тромбином (Omrix Biopharmaceuticals, Израиль) в соотношении 4:1 и вводили в просвет матрикса, после чего добавляли фибриноген (Omrix Biopharmaceuticals, Израиль) в концентрации 35 мг белка/мл. Оставшиеся 2/3 суспензии МСК вводили множественными проколами во внешнюю стенку матрикса. Затем матрикс аорты кролика помещали в бессывороточную среду MesenCult (StemCell Technology, Канада) и переносили в инкубатор при температуре 37 °С в атмосферу 5% CO₂ на 1 ч. Далее матрикс аорты кролика переносили в ротационную трубчатую камеру (Ebers Medical, Испания) и вращали вокруг продольной оси на 360° в течение 2 ч со скоростью 10 об/мин.

Так как расчётный объём матрикса крысиной аорты небольшой, составляя 2 мкл (длина 1 см и площадь поверхности 0,1 см²), заполнение просвета матрикса суспензией МСК с фибриновым гелем трудновыполнимо. Поэтому матрикс крысиной аорты покрывали фибриновым гелем и заселяли МСК в количестве 0,88 млн (0,22 млн смешивали с фибриновым гелем и

вводили несколькими проколами в матрикс; затем 0,20 млн смешивали с тромбином в соотношении 4:1, покрывали поверхность матрикса и затем покрывали фибриногеном; после застывания вновь сформированного слоя геля, оставшиеся 0,46 млн. МСК вводили несколькими проколами в толщу матрикса). Оба матрикса культивировали в течение 4 сут в статичных условиях без перфузии в бессывороточной среде MesenCult.

Заселение матрикса МСК, а также количество выявляемых ядер клеток оценивали с помощью гистологического, ИГХ-исследований и окрашивания DAPI. При этом гистологический анализ с гематоксилином-эозином (Г-Э) и DAPI выполняли для срезов, изъятых на 1-е и 3-е сут культивирования, а ИГХ-реакцию с антителами к Ki67 (Cell Marque, США) ставили для срезов на 4-е сут.

Анализ оцифрованных изображений гистологических срезов и подсчёт ядер клеток проводили с использованием программного обеспечения QuPath 0.2.0.

Статистическая обработка данных

Группы сравнения сформировали в зависимости от метода децеллюляризации матриксов (протокол

1 — протокол 2), от облучения (облученный — не облученный матрикс). Медианы концентраций ДНК представляли как Медиана [25 %; 75 %]. Для сравнения медиан концентраций ДНК использовали критерий Краскела-Уоллиса (с поправкой Данна на множественные сравнения) [7]. Для сравнения частот встречаемости Ki67+ клеток использовали двусторонний критерий Фишера. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ полученных данных выполняли в программе Graphpad Prism 8.0.

Результаты

Оценка эффективности децеллюляризации матриксов

При гистологическом исследовании кроличьей и крысиной аорт, децеллюляризованных в соответствии с протоколами 1 и 2, обнаруживался фокус ядер клеток только на срезе крысиной аорты (протокол 2) (рис. 1Д). Можно заключить, что децеллюляризация матриксов по протоколу 1 более эффективна в отношении удаления ядер клеток.

Для качественной оценки сохранности коллагена I после децеллюляризации матрикса проводили ИГХ

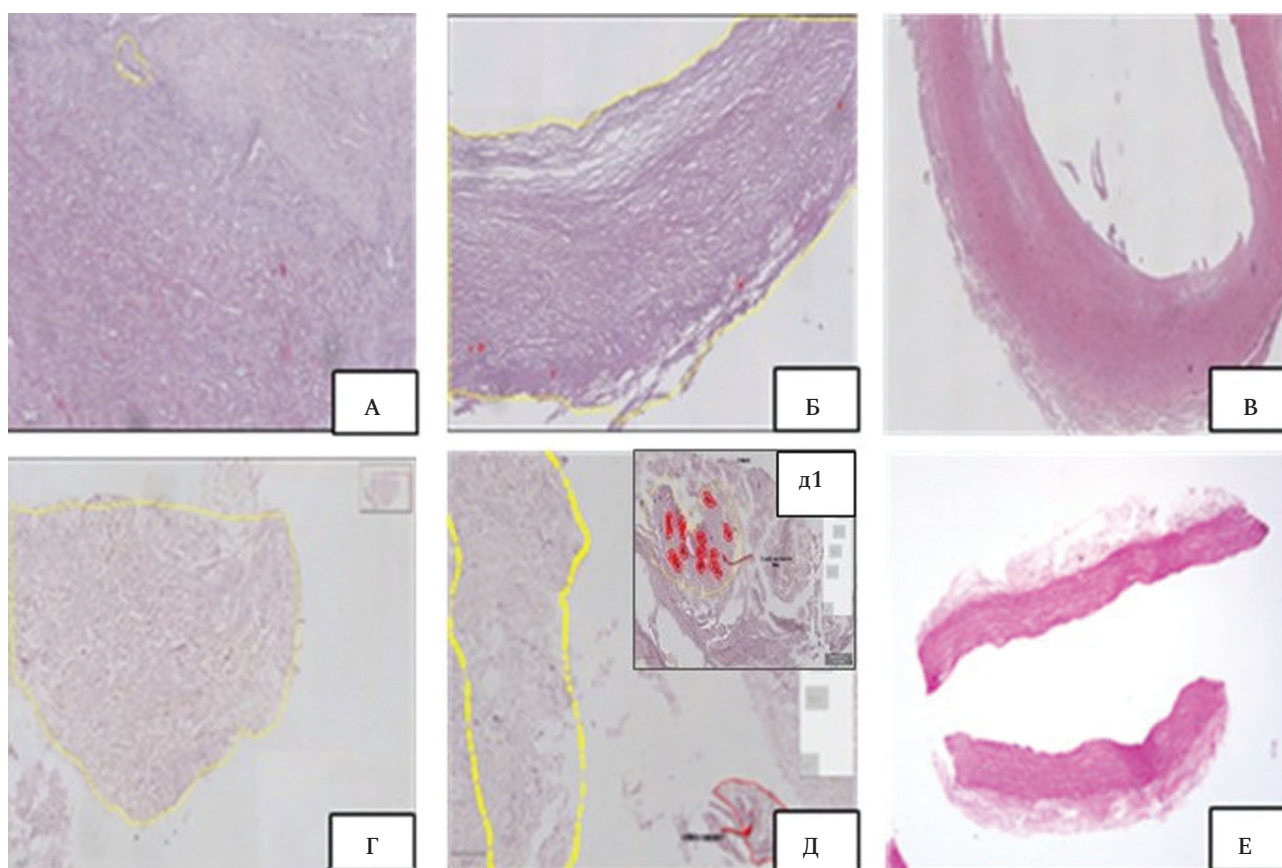


Рис. 1. Результаты гистологического исследования матриксов (окрашивание гематоксин эозином).

А — децеллюляризованная аорта кролика (протокол 1), $\times 100$; Б — децеллюляризованная аорта кролика (протокол 2) $\times 100$; В — нативная аорта кролика, $\times 20$; Г — децеллюляризованная крысиная аорта (протокол 1), $\times 100$; Д — децеллюляризованная аорта крысы, (протокол 2), в выделенном поле зрения (д1) (красным цветом) препарата выявлено 14 ядер; Е — нативная крысиная аорта, $\times 100$

Fig. 1. H&E staining of scaffolds' slices. А — decellularized rabbit aorta (Protocol 1), $\times 100$; Б — decellularized rabbit aorta (Protocol 2); В — native rabbit aorta, $\times 20$; Г — decellularized rat aorta (Protocol 1), $\times 100$; Д — decellularized rat aorta (Protocol 2), within selected field of view (g1) 14 nuclei identified (depicted in red); Е — native rat aorta, $\times 100$

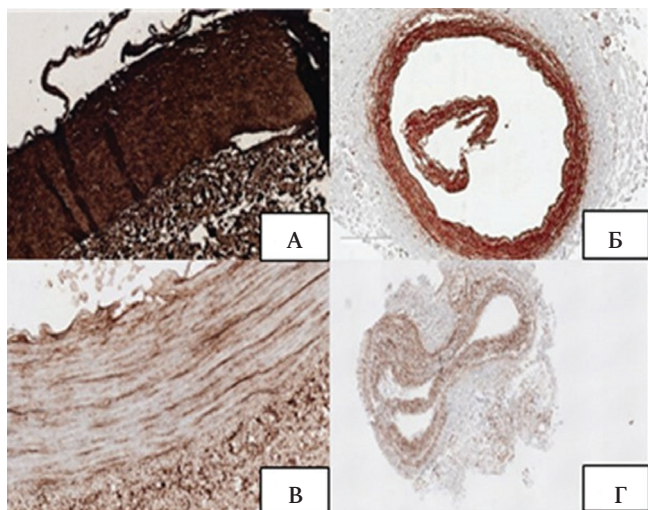


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование децеллюляризованных матриксов на коллаген I типа. А — аорта кролика (протокол 1), $\times 200$; Б — аорта крысы (протокол 1), $\times 100$; В — аорта кролика (протокол 2), $\times 200$; Г — аорта крысы (протокол 2), $\times 40$

Fig. 2. IHC of decellularized scaffolds for collagen I. A — rabbit aorta (Protocol 1), $\times 200$; B — rat aorta (Protocol 1), $\times 100$; C — rabbit aorta (Protocol 2), $\times 200$; D — rat aorta (Protocol 2), $\times 40$

с антителами к коллагену I типа. На рис. 2 выявляется положительная реакция на коллаген I типа во всей толще децеллюляризованного матрикса аорт кролика (рис. 2А и 2В) и крысы (рис. 2Б и 2Г).

С целью визуализации остаточных ядер и хроматина срезы децеллюляризованных матриксов аорт кролика и крыс окрашивали зондом DAPI, тропным к А — Т богатым участкам в минорном желобке двуцепочечной ДНК. Отмечаются единичные слабофлуоресцирующие ядра клеток, при этом фоновая флуоресценция отсутствует. Ядра не определяются, однако выражена фоновая флуоресценция матрикса, что может свидетельствовать о наличии остаточного хроматина в матриксах, децеллюляризованных по протоколу 2. Таким образом, протокол 1 детергентно-ферментативной децеллюляризации обеспечивает более эффективное удаление ядер и хроматина в матриксе.

Содержание остаточной ДНК в матриксах, полученных по протоколам 1 и 2, сравнивали попарно и с нативными сосудами (рис. 3). Медиана концентрации ДНК в матриксах, полученных по протоколу 1, была достоверно ниже, чем в нативном сосуде (контроле) (0,35 [0,25; 0,61] и 5,35 [2,1; 22,9] соответственно, $p < 0,01$ с поправкой на множественные сравнения по Данну).

Таким образом, основываясь на анализе эффективности децеллюляризации матриксов, было решено в дальнейшем использовать сосудистые матриксы лабораторных животных, децеллюляризованных по протоколу 1.

Анализ заселения необлучённого и облучённого сосудистых матриксов

Проводили γ -облучение децеллюляризованных матриксов аорты лабораторных животных в сверхвысокой дозе 30 кГр в течение 40 мин, как и ранее [3].

Результаты заселения оценивали с помощью гистологического, ИГХ-исследований и окрашивания

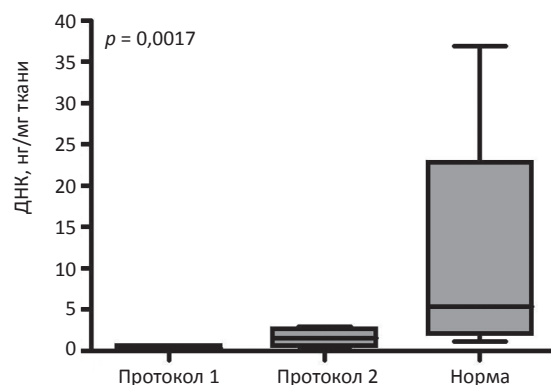


Рис. 3. Результаты оценки содержания остаточной ДНК в сосудах (критерий Краскела-Уоллеса с поправкой Данна на множественные сравнения)

Fig. 3. Evaluation of residual DNA quantification in vascular scaffolds. The data was analysed by use of Kruskal-Wallis non-parametric method and Dunn's post-hoc test

DAPI. При этом гистологический анализ с Г-Э и DAPI выполняли для срезов, изъятых на 1-е и 3-е сут культивирования, а ИГХ-реакцию с антителами к Ki67 ставили для срезов 4-ых сут (рис. 4–5).

Как видно из рис. 5, ядра МСК плаценты распределялись в толще фибринового геля диффузно и крайне неравномерно (рис. 4 А, В, Г). На рис. 4,61 приведён фрагмент необлучённого матрикса крысиной аорты, в котором ядра МСК локализованы исключительно в разрыхлённой адвентиции матрикса, часть ядер определяется в интимае. Общее количество ядер, выявленных при анализе срезов необлучённого матрикса крысиной аорты и фибринового геля, составило 270. Суммарное количество Ki67⁺ ядер, выявленных в результате анализа среза фибринового геля (4-е сут), составило 25 из 84 (29,8%).

На рис. 5 показано, что морфологически различимые ядра МСК идентифицируются у границы между облучённым матриксом и фибриновым гелем на препарате, окрашенном DAPI на 1-е сут культивирования (рис. 5В) и на 4-е сут при окрашивании на Ki67 (рис. 5Д, д1). На рис. 5 д1 в выделенном поле зрения обнаружили 41 ядро, при этом 7,5% (3 ядра) характеризовались как Ki67⁺. На рис. 5Б выявлено разрушение и расслоение волокон коллагена.

Таким образом, на срезах облучённого матрикса, изъятых на 3-е сут культивирования и окрашенных Г-Э и DAPI, ядра клеток не определялись (рис. 5Б, Г), в отличие от необлучённого матрикса, в котором морфологически различимые ядра выявляли всеми методами.

Частота встречаемости Ki67⁺ ядер на 4-е сут в необлучённом матриксе была достоверно выше по сравнению с облучённым матриксом ($p = 0,0054$) (рис. 6).

Таким образом, наблюдается ассоциация действия облучения в сверхвысокой дозе 30 кГр со снижением количества пролиферирующих Ki67⁺ клеток.

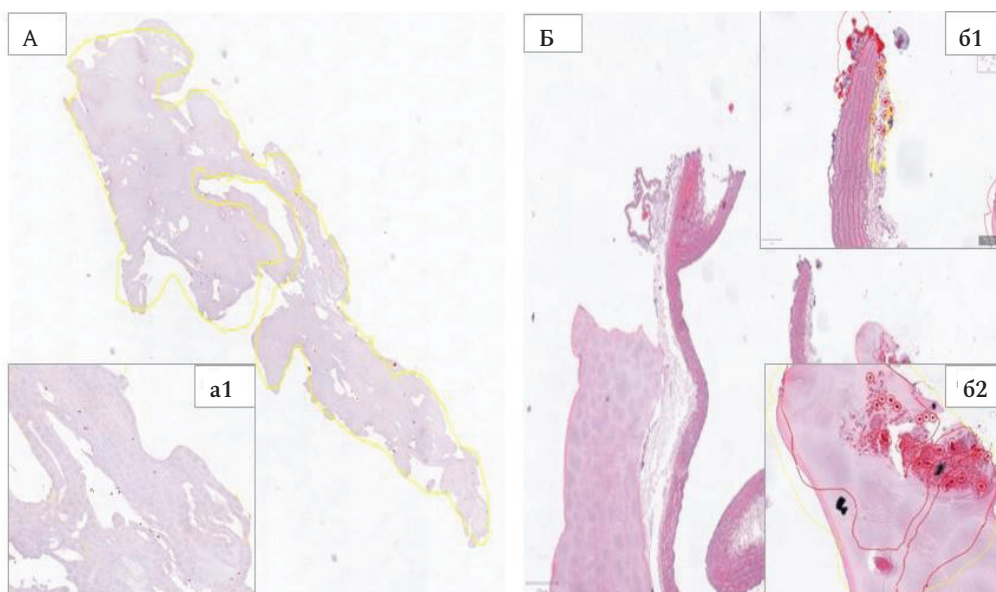


Рис. 4. Результаты заселения МСК плаценты необлучённого матрикса аорты крысы. (А–Б): гематоксилин — эозин, изображения срезов, отсканированных при $\times 20$. А — фибриновый гель (день 1), а1 — выделенное поле зрения, обнаруживаются ядра клеток; Б — срез матрикса, заключённого в фибриновый гель (день 3), б1 — в поле зрения выделен фрагмент матрикса крысиной аорты с выделенными в результате программной обработки ядрами, б2 — в поле зрения выделен фрагмент фибринового геля с обнаруженными ядрами

Fig. 4. Images of the non-irradiated rat aorta scaffold repopulated by hMSCs. (A–B): H&E — staining of scaffold's slices, obtained by scanning at $\times 20$ magnification. A — fibrin glue (day 1), a1 — selected region of interest, cell nuclei are identified by QuPath algorithm; B — scaffold's slices (scaffold is embedded within fibrin glue) (day 3), b1 — in the field of view the rat aorta scaffold's fragment with cell nuclei outlined by QuPath algorithm; b2 — in the field view the fibrin glue region containing nuclei is selected

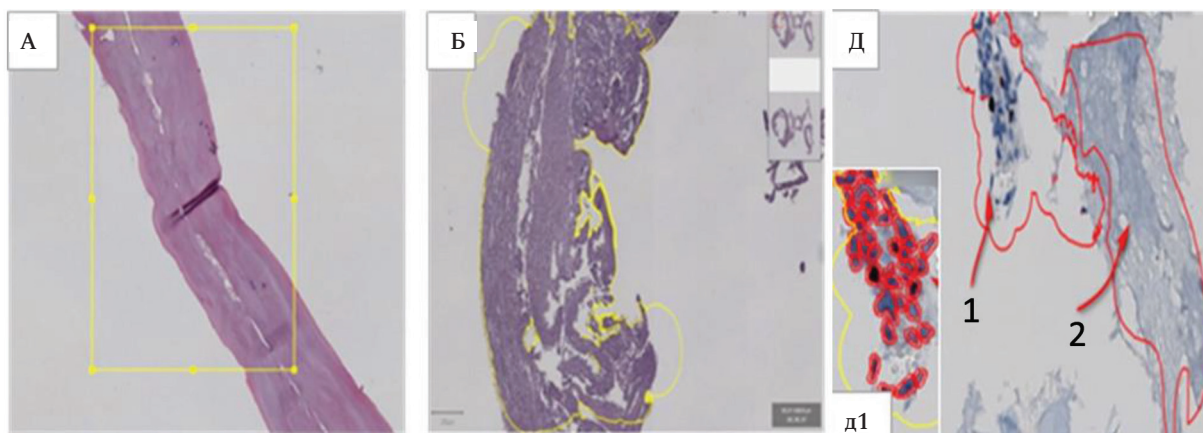


Рис. 5. Результаты заселения МСК плаценты облучённого матрикса крысиной аорты. (А–Б): гематоксилин — эозин, изображения срезов, отсканированных при $\times 20$. А — фибриновый гель (день 1), ядра клеток не обнаруживаются; Б — срез матрикса (день 3). (Д): ИГХ на Ki67. Д — матрикс — фибриновый гель (день 4), д1 — область выделения с фрагментом матрикса после программной обработки, было выявлено 41 ядро, 3 ядра — Ki67+

Fig. 5. Images of the irradiated rat aorta scaffold repopulated by hMSCs. (A–B): H&E — staining of scaffold's slices, obtained by scanning at $20\times$ magnification. A — fibrin glue (day 1), no cell nuclei can be identified; B — rat aorta scaffold's slice on day 3. (Д): IHC for Ki67. Д — scaffold — fibrin glue interface (day 4), д1 — the selected region of interest including scaffold's fragment after image processing. 41 cell nuclei were identified and three are Ki67 among them

Обсуждение

В настоящем исследовании показана нерациональность использования додецилсульфата натрия (SDS) как децеллюляризирующего агента: во-первых, протокол 1, основанный на сочетании ионного детергента дезоксихолата натрия (NaDOC) и неионного TritonX100, обеспечивал более эффективное удаление

геномной ДНК по сравнению с SDS-основанным протоколом децеллюляризации (протокол 2); во-вторых, ранее было показано, что SDS обладает цитотоксическим эффектом даже в следовых концентрациях [8].

Фибриновый гель, в отличие от ряда синтетических материалов, характеризуется нетоксичными продуктами деградации, хорошей биосовместимостью и

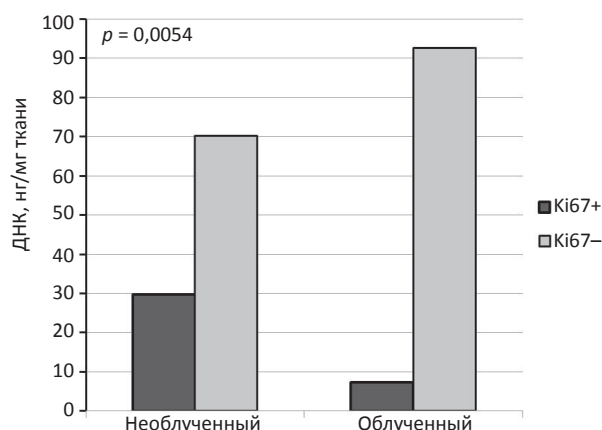


Рис. 6. Частота встречаемости Ki67+ ядер, выявляемых на гистологических срезах (4-е сут) необлученного и облученного матриксов

Fig. 6. Frequency of Ki67+ nuclei identified on histologic slices (day 4) for both non — irradiated and irradiated scaffolds.

высокой адгезивностью. Было показано сохранение жизнеспособности и пролиферативной активности мышинных фибробластов 3T3, культивируемых в течение 4 сут в фибриновом гидрогеле толщиной не более 2 мм [9]. Поэтому смешивание клеточной суспензии с фибриновым гелем и заполнение полученной смесью просвета трубчатого матрикса, возможно, повышает эффективность заселения полноразмерного каркаса, что следует оценить для необлученных матриксов в дальнейшем исследовании.

Результаты проведенного исследования показывают наличие ассоциации между облучением децеллюляризованного матрикса в сверхвысокой дозе

(30 кГр) и снижением числа пролиферирующих клеток (Ki67+) при последующем заселении матрикса.

Облучение матриксов с целью радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе (30 кГр) не обосновано и приводит к потере био- и цитосовместимости тканеинженерных конструкций. Аналогичные эффекты были описаны для низких доз облучения [10]. Так, N. Roognejad et al, которые провели сравнительную оценку влияния 4 методов стерилизации децеллюляризованного ренального матрикса свиньи (гамма-облучение, 70% этанол, 0,2% надуксусная кислота в 1M NaCl и 0,2% надуксусная кислота в 4% этаноле) на сохранность структуры матрикса и его способность поддерживать рост, адгезию и пролиферацию клубочкового эпителия. Авторами было показано, что при культивировании клубочковых эпителиальных клеток на матриксах, облученных в минимальной стерилизующей дозе 3 кГр, наблюдается достоверное снижение количества двухцепочечной ДНК на 1-е и 3-е сут культивирования (непрямой метод оценки пролиферативной активности клеток) [10].

Другими исследователями продемонстрировано, что радиационная стерилизация приводит к необратимым изменениям структурных и реологических свойств гидрогелей децеллюляризованных матриксов и к невозможности гелеобразования [3].

Закключение

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что облучение матриксов в сверхвысокой дозе 30 кГр приводит к потере цитосовместимости тканеинженерных конструкций. Необходимо продолжать изучение воздействия других методов стерилизации медицинских изделий на адгезивные свойства матриксов.

Evaluation of Ultrahigh Dose Irradiation Sterilization Influence on Cytocompatibility of Decellularized Vascular Scaffolds

V.A. Brumberg, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, T.F. Malivanova, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brunchukov, A.A. Rastorgueva, S.V. Lischuk, A.M. Borbat, E.A. Dubova, M.L. Ganzhelyuk, A.E. Makhova, T.V. Karaseva, E.I. Dobrovolskaya, E.E. Lomonosova, M.A. Taratonenkova, A.Yu. Bushmanov, A.S. Samoilov

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

E-mail: t_astrelina@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To study the effect of radiation sterilization at an ultra-high dose of 30 kGy on the cytocompatibility of decellularized vascular scaffolds repopulated with placenta MSCs.

Material and methods: The material of the study were aortas of laboratory animals (rabbits and rats, three vessels for each animal species), which were subjected to detergent-enzymatic perfusion decellularization by two protocols differing in reagents composition. Then the scaffold decellularized by the most efficient protocol was irradiated at a dose of 30 kGy and repopulated with placenta MSCs. As a control, the unirradiated matrix was seeded with cells of the same type. Histological staining of hematoxylin-eosin (H&E), IHC for type I collagen and Ki67, DAPI staining and quantitative assessment of genomic DNA were used to evaluate the effectiveness of decellularization and seeding. Scaffolds seeding was assessed by analyzing serial sections taken on day 1st, 3rd, and 4th of culture.

Results: The scaffolds obtained in accordance with Protocol 1 were characterized by the absence of detectable cell nuclei, while the DNA content in them was significantly lower compared to Protocol 2. On the digitized images of sections of the unirradiated matrix, the cell nuclei were determined for routine H&E and DAPI staining while for the irradiated scaffold the cell nuclei were visualized on the border between the scaffold and fibrin gel only on DAPI stained section at 1st day of culture. The frequency of

occurrence of Ki67+ nuclei on the 4th day of culture was significantly lower for the irradiated scaffold in comparison with the non-irradiated scaffold (7.5% and 29.8%, respectively, $p = 0.0054$).

Conclusion: Scaffold irradiation leads to loss of cytocompatibility of tissue-engineering constructs.

Key words: *tissue engineering, regenerative medicine, scaffold, fibrin gel, static settlement, ultra-high doses, radiation sterilization*

For citation: Brumberg VA, Astrelina TA, Kobzeva IV, Nikitina VA, TF Malivanova, Usupzhanova DYU, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Lischuk SV, Borbat AM, EA Dubova, Ganzhelyuk ML, Makhova AE, TV Karaseva, EI Dobrovolskaya, Lomonosova EE, Taratonenkova MA, Bushmanov AYU, Samoilov AS. Evaluation of Ultrahigh Dose Irradiation Sterilization Influence on Cytocompatibility of Decellularized Vascular Scaffolds Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):5-11 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-5-11

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Villalona GA, Udelsman B, Duncan DR, McGillicuddy E, Sawh-Martinez RF, et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Jun 16;3:341-50. PubMed PMID: 20085439. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0527.
- Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 2014 Apr;10(4):1502-14. PubMed PMID: 24056097. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.008
- White LJ, Keane TJ, Smoulders A, Zhang L, Castleton A, Badylak SF. The effects of terminal sterilization upon the biological activity and stiffness of extracellular matrix hydrogels. *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract* (2016): 10th World Biomaterials Congress. DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00032.
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16878. PubMed PMID: 29203879. DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, Hagan RS, Craig S, McCorry A, et al. Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology.* 2018;73:327-38. DOI: 10.1111/his.13516.
- Астрелина ТА, Яковлева МВ, Шахпазян НК и др. Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012;7(4):68-72. [Astrelina TA, Yakovleva MV, Shahpazyan NK, Gomzyakov AE, Skorobogatova EV, Karpova EV, Kobzeva IV. Significance of human herpesvirus detection in multipotent mesenchymal stromal stem cells for clinical practice. *Cell Transplantation and Tissue Engineering.* 2012;7(4):68-72. (In Russ.).]
- McHugh ML. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem Med.* 2011;21(3):203-9.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):399-405. PubMed PMID: 147623474. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.017
- Ryzhuk V, Zeng XX, Wang X, Melnychuk V, Lankford L, Farmer D, Wang A. Human amnion extracellular matrix derived bioactive hydrogel for cell delivery and tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2018;85:191-202. PubMed PMID: 29407148. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.026.
- Poornejad N, Nielsen JJ, Morris RJ, et al. Comparison of four decontamination treatments on porcine renal decellularized extracellular matrix structure, composition, and support of renal tubular epithelium cells. *J Biomaterials Applications.* 2016;30(8):1154-67. PubMed PMID: 26589294. DOI: 10.1177/0885328215615760.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 03.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 03.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Brumberg V.A. <https://orcid.org/0000-0001-6053-1637>.
 Astrelina T.A. <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>.
 Kobzeva I.V. <https://orcid.org/0000-0002-1499-8954>.
 Nikitina V.A. <https://orcid.org/0000-0002-3150-7686>.
 Malivanova T.F. <https://orcid.org/0000-0001-9699-260>.
 Usupzhanova D.Yu. <https://orcid.org/0000-0002-3894-7182>.
 Brunchukov V.A. <https://orcid.org/0000-0002-5744-5524>.
 Rastorgueva A.A. <https://orcid.org/0000-0003-2159-7304>.
 Karaseva T.V. <https://orcid.org/0000-0001-7369-2931>.
 Samoylov A.S. <https://orcid.org/0000-0002-9241-7238>.

В.Ю. Нугис¹, Г.П. Снигирёва², Е.Е. Ломоносова¹, М.Г. Козлова¹, В.А. Никитина¹

ТРЁХЦВЕТНЫЙ FISH-МЕТОД: КРИВЫЕ ДОЗА–ЭФФЕКТ ДЛЯ ТРАНСЛОКАЦИЙ В КУЛЬТУРАХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ *IN VITRO*

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава РФ, Москва

Контактное лицо: Владимир Юрьевич Нугис, nugisvju@list.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Построение кривых доза–эффект для транслокаций, выявленных с помощью трёхцветного FISH-метода, по результатам цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови здоровых доноров после гамма-облучения *in vitro*.

Материал и методы: Использовалась венозная кровь трёх доноров (2 мужчин и 1 женщина в возрасте от 28 лет до 41 года), подвергнутая гамма-облучению *in vitro* от источника ⁶⁰Co в дозах 0,10; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 и 3,00 Гр при температуре 37 °С (мощность дозы 0,5 Гр/мин). Для трёхцветного FISH-окрашивания использовались два разных набора ДНК-зондов к 1, 4, 12 и 2, 3, 8 парам хромосом. Для анализа отбирали метафазы с квазидиплоидным числом хромосом (40–46) и полным набором всех FISH-окрашенных хромосом с учётом всей их суммарной длины. Также производилась дифференциация стабильных и нестабильных клеток. При цитогенетическом анализе применялась традиционная терминология с обозначением транслокаций как реципрокных (полных, двухсторонних), нерципрокных (терминальных, неполных или односторонних) или интерстициальных.

Результаты: Полученные численные данные были использованы для сравнения статистических частот FISH-регистрируемых транслокаций при использовании разных наборов ДНК-зондов, при подсчёте aberrаций хромосом во всех (нестабильных и стабильных) и стабильных метафазных клетках, сопоставлении частот FISH-регистрируемых транслокаций и дицентриков и оценке вклада уровня транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом в общую частоту транслокаций.

Цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток выявил тенденцию к регистрации более низких уровней транслокаций, чем при анализе всех клеток (нестабильных и стабильных), при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр. Уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом оказался очень низким, что явно не способствует увеличению чувствительности FISH-метода при ретроспективной оценке дозы по сравнению с его одноцветным вариантом. В то же время, трёхцветная FISH-окраска позволяет выявлять такие варианты хромосомных перестроек, которые не регистрируются с помощью одноцветного FISH-метода.

Заключение: Построенные кривые доза–эффект в целом соответствовали линейно-квадратичной зависимости. Дозовые зависимости, полученные для транслокаций при использовании двух разных выбранных трёхцветных наборов ДНК-зондов, статистически значимо не различаются между собой.

Ключевые слова: периферическая кровь, культура лимфоцитов, гамма-облучение *in vitro*, трёхцветный FISH-метод, транслокации, зависимость доза–эффект

Для цитирования: Нугис В.Ю., Снигирёва Г.П., Ломоносова Е.Е., Козлова М.Г., Никитина В.А. Трёхцветный FISH-метод: кривые доза–эффект для транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови после гамма-облучения *in vitro*. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):12–20.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20

Введение

В периодически переиздаваемых международных рекомендациях МАГАТЭ [1] по использованию анализа aberrаций хромосом в качестве способа биологической дозиметрии в связи с радиационными происшествиями большое внимание уделяется не только индикации дозы острого облучения в ближайшие сроки после воздействия с помощью классического метода окраски хромосом, но и возможностям применения различных цитогенетических подходов для ретроспективной оценки полученных доз. Обусловлено это наличием случаев позднего поступления пациентов в специализированные учреждения; обращениями граждан, проживающих/проживавших на загрязнённых территориях; необходимостью решения вопросов медико-социальной экспертизы при установлении причинной связи развившихся заболеваний с радиационным воздействием для верификации самого факта переоблучения и при попытках определить полученную дозу в отдалённые сроки.

В настоящее время для этих целей из цитогенетических методов наиболее часто используется вариант одноцветного FISH-окрашивания хромосом, что позволяет выявлять реципрокные транслокации, не представляющие механического препятствия для протекания митоза и относящиеся поэтому к стабильному (во времени) типу перестроек хромосом [1]. При этом используются комплементарные к ДНК хромосом наборов цельнохромосомных ДНК-зондов с присоединённым каким-либо одним флуоресцентным красителем. Обычно выбирают три пары хромосом из групп А, В и С, так как они являются наиболее крупными в кариотипе человека. В то же время, по видимому, исследователи не хотят ограничиваться наибольшими хромосомами только из группы А, хотя в целом большинство исходит из гипотезы о зависимости вероятности вовлечения каждой данной хромосомы в перестройку только от количества содержащегося в ней ДНК. Правда, её следовало бы проверить более досконально. Также было бы интересно узнать, насколько может повлиять на чувствительность

FISH-метода регистрация обменов не только между тремя выбранными FISH-окрашенными и контрокрашенными хромосомами, но и между самими этими FISH-окрашенными хромосомами.

В свете выше сказанного было предпринято настоящее изучение продукции аббераций хромосом (главным образом реципрокных транслокаций) в культурах лимфоцитов периферической крови людей после гамма-облучения *in vitro* с помощью трёхцветного варианта FISH-окрашивания. При этом были использованы два набора ДНК-зондов к разным парам хромосом.

Материал и методы

Материалом цитогенетических исследований служила полученная из кубитальной вены кровь трёх здоровых доноров (двое мужчин в возрасте 35 лет и 41 год и одна женщина в возрасте 28 лет). Первоначальный забор крови необходимого суммарного объёма (44 мл) производился примерно по 8–9 мл в вакуумные пластиковые пробирки BD Vacutainer с гепарином лития. Затем кровь в стерильных условиях разливалась в стерильные пробирки типа Эппендорф объёмом 2 мл. Радиационное воздействие на кровь в этих пробирках осуществляли *in vitro* при 37 °С (водяная баня) гамма-излучением ⁶⁰Со на терапевтической установке «Луч» в дозах 0,10; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 и 3,00 Гр при мощности дозы 0,5 Гр/мин (не менее двух пробирок для каждой дозы). Также две пробирки оставались необлучёнными для регистрации контрольного уровня аббераций хромосом.

Облучённая и необлучённая кровь была использована для постановки в стерильных условиях культур лимфоцитов периферической крови в соответствии со следующей методикой. Отдельные порции цельной крови объёмом 2 мл вносились в культуральную смесь 18 мл среды RPMI 1640 с GlutaMAX™-I (фирма Thermo Fisher Scientific) с 20% инактивированной телячьей сывороткой и добавлением фитогемагглютина (ФГА-П) в конечной концентрации 20 мкг/мл (фирма «ПанЭко», Россия) и антибиотиков стрептомицина и пенициллина (растворены предварительно в среде). Культивирование производили в стерильных культуральных флаконах 25 см² (фирма NUNC) в вертикальном положении. Для того чтобы избежать появления в культурах существенного числа метафаз во втором митозе, время инкубации в термостате при 37 °С составило 50 ч. За 2–2,5 ч до его окончания в культуральную среду добавляли колхицин (0,5 мкг/мл) для остановки протекания митозов в стадии метафазы.

Препараты хромосом готовили стандартным способом: гипотония с помощью подогретого до 37 °С 0,075 М KCl в течение 10–20 мин; центрифугирование при 3000 об./мин в течение 5 мин; отсасывание надосадочной жидкости и фиксация клеток охлаждённой в холодильнике смесью метанола (96%-этанола) и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1; взвесь оставляли в холодильнике на 20 мин; после — центрифугирование при 1500 об./мин в течение 10 мин; слив надосадочной жидкости; смена фиксатора и ресуспендирование осадка ещё два раза с постепенным уменьшением объёма добавляемого фиксатора

до примерно 1 мл; раскапывание полученной взвеси (3–4 капли) на чистые охлаждённые обезжиренные предметные стёкла и высушивание препаратов на термоплате при 45 °С.

При выполнении трёхцветного FISH-метода окрашивания хромосом использовали готовые наборы ДНК-зондов к целым хромосомам № 1, 4, 12 и № 2, 3, 8 (XCP — chromosome painting probe — Probe Mix, Customized 3 colors; контрокраситель — DAPI) фирмы MetaSystems (Германия). По суммарному относительному содержанию ДНК оба этих набора почти идентичны друг к другу. Доля ДНК в них по отношению к диплоидному набору хромосом у мужчин равняется 0,1917 и 0,1966 соответственно (таблица для данного расчёта приведена в рекомендациях [1]). При обработке и окраске препаратов хромосом руководствовались прилагаемой к набору фирменной инструкцией.

Полученные окрашенные препараты были помещены в ячейки автоматизированного предметного столика системы Metafer 4 (MetaSysytems, Германия). С её помощью производился автоматический поиск метафаз на разных препаратах и их фотографирование с использованием различных световых фильтров. В результате в базе данных устройства для каждого донора был накоплен двойной набор метафазных клеток с трёхцветными FISH-окрашенными тремя парами хромосом и контрокрашенными (DAPI) остальными хромосомами, которые в дальнейшем подвергались цитогенетическому анализу с использованием компьютерных дисплеев. Для анализа отбирали метафазы с квазидиплоидным числом хромосом (40–46) и полным набором всех FISH-окрашенных хромосом с учётом всей их суммарной длины. Такой подход привёл к тому, что метафазы, содержавшие деления по этим хромосомам, не были включены в итоговые результаты анализа. В конечный расчёт вошли только перестройки хромосомного типа, в продукции которых участвовали FISH-окрашенные регионы.

Также производилась дифференциация стабильных и нестабильных клеток. К первым относились неабберантные метафазы и метафазы, содержавшие только стабильные перестройки хромосом — реципрокные транслокации, перичентрические инверсии, инсерции, контрокрашенные атипичные хромосомы. Во-вторых, могли наблюдаться и нестабильные абберации хромосом — FISH-окрашенные и контрокрашенные дицентрики, центрические и ацентрические кольца, парные фрагменты.

При цитогенетическом анализе применялась традиционная терминология с обозначением транслокаций как реципрокных (полных, двухсторонних), нереципрокных (терминальных, неполных или односторонних) или интерстициальных [1]. К последним относятся инверсии и вставки (инсерции). Противоположные понятия, то есть полная — неполная или реципрокная — нереципрокная, связаны с концепциями механизмов образования транслокаций. Абберации считаются завершёнными (полными), когда все отломанные куски воссоединились (хотя бы и неправильно) и неполными, когда один или несколько участков остаются невоссоединёнными. Нереципрокность транслокации означает, что перенос материала произошёл только от одной хромо-

сомы к другой, т.е. однонаправлено. Ко второй же хромосоме никакой дополнительный материал не присоединился. Поэтому в рекомендациях МАГАТЭ [1] считается, что для целей биологической дозиметрии исключительно на основе их внешнего вида, по-видимому, лучше называть транслокации двух- или односторонними без каких-либо теоретических выводов о механизмах их возникновения. На самом деле, видимая «односторонность» транслокации не обеспечивает надежную оценку неполноты или нераспознаваемости обмена [1]. Цитологически видимая неполная транслокация может оказаться полной на молекулярном уровне, так как один из переносимых сегментов может быть слишком мал для визуализации под микроскопом [2]. В работе [3] граница разрешения современной FISH-технологии полагается равной $(11-15) \times 10^6$ н.п. В статье [4] с помощью мечения теломер облучённых хромосом было показано, что многие, по всей видимости, нераспознаваемые транслокации на молекулярном уровне были на самом деле реципрокными, и частота неполных обменов была очень низкой. Исходя из этого, для ретроспективной оценки дозы предлагается учитывать только общую частоту транслокаций без разделения их на полные — неполные или реципрокные — нераспознаваемые.

Для статистической обработки полученных результатов (сравнение средних и регрессионный анализ) использовали пакет программ Statistica 6. Критической величиной уровня значимости считали 0,05.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены усреднённые результаты цитогенетического анализа культур лимфоцитов периферической крови указанных выше трёх здо-

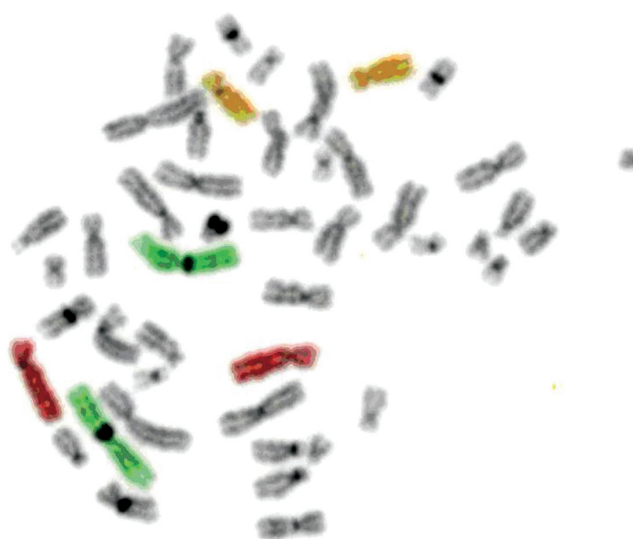


Рис. 1. Нормальная метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й (жёлтые) парами хромосом
Fig. 1. Normal metaphase with FISH-painting 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes

ровых доноров при использовании трёхцветного FISH-окрашивания с помощью ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом. Аналогичные данные приведены в табл. 2 для ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом. На рис. 1 представлена нормальная метафаза при использовании ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом, а на рис. 2 и 3 показаны метафазы с транслокацией между 3-й и контрольно окрашенными хромосомами и между 1-й и 4-й хромосомами соответственно.

Таблица 1

Средние частоты ($\pm$ стандартные ошибки) FISH-окрашенных aberrаций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров в контроле и после гамма-облучения *in vitro* при использовании трёхцветных ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом

Mean frequencies ($\pm$ standard errors) of FISH-painting chromosome aberrations in peripheral blood lymphocyte cultures of three healthy donors in control and after gamma irradiation *in vitro* using three-color DNA probes to 1, 4 and 12 pairs of chromosomes

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Общая частота транслокаций на 100 клеток различного типа		Частота инверсий на 100 клеток	Частота инверсий на 100 клеток	Частота дигетриков на 100 клеток	Частота центрических колец на 100 клеток	Частота ацентриков на 100 клеток	Частота транслокаций на 100 клеток на весь геном	
			Все клетки	Стабильные клетки						Все клетки	Стабильные клетки
0	2953	2944	0,22 $\pm$ 0,11	0,23 $\pm$ 0,12	0	0	0,03 $\pm$ 0,03	0	0,03 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,33	0,66 $\pm$ 0,34
0,10	2621	2613	0,42 $\pm$ 0,11	0,42 $\pm$ 0,11	0	0	0,03 $\pm$ 0,03	0	0,05 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,31	1,24 $\pm$ 0,31
0,15	2073	2055	0,39 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,10	0	0	0,12 $\pm$ 0,08	0	0,13 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,28	1,14 $\pm$ 0,29
0,25	2279	2252	0,68 $\pm$ 0,12	0,64 $\pm$ 0,14	0	0	0,23 $\pm$ 0,12	0	0,13 $\pm$ 0,08	1,99 $\pm$ 0,36	1,88 $\pm$ 0,39
0,35	1802	1774	0,94 $\pm$ 0,25	0,95 $\pm$ 0,24	0	0	0,32 $\pm$ 0,14	0	0,58 $\pm$ 0,21	2,75 $\pm$ 0,71	2,78 $\pm$ 0,70
0,50	3306	3254	1,30 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,04	0	0,03 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,15	0,03 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,13	3,82 $\pm$ 0,01	3,72 $\pm$ 0,14
0,75	2207	2139	3,04 $\pm$ 0,79	3,05 $\pm$ 0,75	0	0	0,63 $\pm$ 0,16	0,04 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,27	8,87 $\pm$ 2,28	8,94 $\pm$ 2,18
1,00	2466	2312	3,55 $\pm$ 0,50	3,47 $\pm$ 0,58	0,08 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,08	1,54 $\pm$ 0,35	0,05 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,38	10,41 $\pm$ 1,46	10,17 $\pm$ 1,66
1,50	1797	1589	7,72 $\pm$ 0,77	7,56 $\pm$ 0,79	0,08 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03	2,86 $\pm$ 0,94	0,12 $\pm$ 0,12	2,05 $\pm$ 0,68	22,74 $\pm$ 2,23	22,29 $\pm$ 2,27
2,00	2217	1823	11,37 $\pm$ 2,00	10,52 $\pm$ 2,26	0,05 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,03	4,77 $\pm$ 0,82	0,31 $\pm$ 0,21	4,16 $\pm$ 0,48	35,45 $\pm$ 5,60	32,26 $\pm$ 5,13
3,00	1462	900	25,74 $\pm$ 3,06	21,89 $\pm$ 2,16	0,18 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,04	12,22 $\pm$ 1,64	0,92 $\pm$ 0,13	10,69 $\pm$ 1,50	74,62 $\pm$ 8,79	63,32 $\pm$ 6,02

Примечание: При определении стабильности клеток учитывали не только aberrации по FISH-окрашенным, но и по контрокрашенным хромосомам

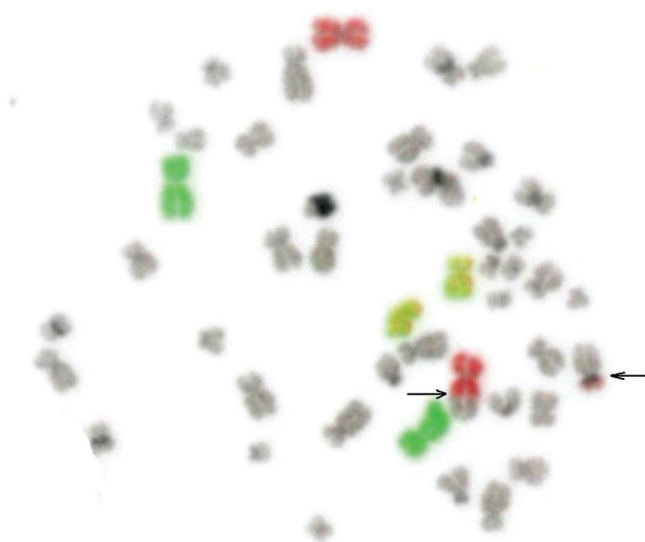


Рис. 2. Метафаза с FISH-окрашенными 2-й (зелёные), 3-й (красные) и 8-й (жёлтые) парами хромосом и транслокацией между 3-й и контрольнокрашенной хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)

Fig. 2. Metaphase with FISH-stained 2 (green), 3 (red) and 8 (yellow) pairs of chromosomes and translocation between 3 and counterstained chromosomes (break points are indicated by arrows)

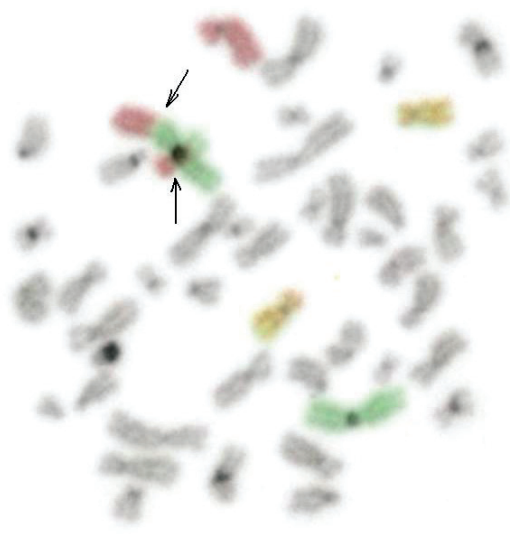


Рис. 3. Метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й (жёлтые) парами хромосом и транслокацией между 1-й и 4-й хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)

Fig. 3. Metaphase with FISH-stained 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes and translocation between 1 and 4 chromosomes (break points are indicated by arrows)

С помощью *t*-критерия Стьюдента с попарно связанными вариантами было продемонстрировано отсутствие существенных отличий между двумя разными использованными наборами ДНК-зондов при определении фоновых и индуцированных при разных дозах частот транслокаций: уровень значимости *p* вне зависимости от дозы варьировал от 0,124 до 0,928 при

исследовании всех (и нестабильных, и стабильных) клеток. При этом цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток выявлял тенденцию или имел статистическую значимость регистрации более низких уровней aberrаций хромосом, чем при анализе всех клеток, при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр: для набора ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам

Таблица 2

Средние частоты ($\pm$ стандартные ошибки) FISH-окрашенных aberrаций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров в контроле и после гамма-облучения *in vitro* при использовании трёхцветных ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом

Mean frequencies ($\pm$ standard errors) of FISH-stained chromosome aberrations in peripheral blood lymphocyte cultures of three healthy donors in control and after gamma irradiation *in vitro* using three-color DNA probes to 2, 3 and 8 pairs of chromosomes

Доза, Гр	Число проанализированных клеток	Число стабильных клеток	Общая частота транслокаций на 100 клеток различного типа		Частота инверсий на 100 клеток	Частота инверсий на 100 клеток	Частота дигенетических колец на 100 клеток	Частота центрических колец на 100 клеток	Частота ацентриков на 100 клеток	Частота транслокаций на 100 клеток на весь геном	
			Все клетки	Стабильные клетки						Все клетки	Стабильные клетки
0	2280	2271	0,03 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,03	0	0	0	0	0,10 $\pm$ 0,10	0,09 $\pm$ 0,09	0,10 $\pm$ 0,10
0,10	2798	2783	0,47 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,11	0	0	0,03 $\pm$ 0,03	0	0,27 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,27	1,31 $\pm$ 0,28
0,15	2117	2102	0,44 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,12	0	0	0,05 $\pm$ 0,05	0	0,18 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,25	1,09 $\pm$ 0,36
0,25	2587	2576	0,66 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,12	0	0,04 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,06	0	0,16 $\pm$ 0,16	1,90 $\pm$ 0,13	1,67 $\pm$ 0,33
0,35	2368	2332	0,92 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,11	0	0	0,22 $\pm$ 0,10	0	0,42 $\pm$ 0,14	2,63 $\pm$ 0,22	2,43 $\pm$ 0,33
0,50	3006	2931	1,43 $\pm$ 0,18	1,46 $\pm$ 0,18	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,16	0	0,38 $\pm$ 0,19	4,09 $\pm$ 0,49	4,20 $\pm$ 0,50
0,75	2714	2589	2,50 $\pm$ 0,19	2,26 $\pm$ 0,10	0	0	1,13 $\pm$ 0,13	0,14 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,38	7,19 $\pm$ 0,55	6,49 $\pm$ 0,34
1,00	1750	1636	3,59 $\pm$ 0,60	3,29 $\pm$ 0,45	0,05 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,21	10,46 $\pm$ 1,82	9,63 $\pm$ 1,36
1,50	2173	1880	6,68 $\pm$ 0,97	5,71 $\pm$ 1,40	0,15 $\pm$ 0,15	0,04 $\pm$ 0,04	4,24 $\pm$ 0,86	0,04 $\pm$ 0,04	2,25 $\pm$ 0,38	20,10 $\pm$ 3,02	17,06 $\pm$ 4,30
2,00	1749	1432	10,92 $\pm$ 2,27	9,06 $\pm$ 2,04	0,11 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,27	5,28 $\pm$ 1,36	0,46 $\pm$ 0,12	4,25 $\pm$ 0,85	31,92 $\pm$ 5,81	26,98 $\pm$ 4,84
3,00	2100	1256	23,79 $\pm$ 1,33	19,67 $\pm$ 0,70	0,77 $\pm$ 0,34	0,48 $\pm$ 0,10	14,29 $\pm$ 1,30	0,90 $\pm$ 0,20	11,20 $\pm$ 0,63	68,84 $\pm$ 3,08	55,30 $\pm$ 3,08

Примечание: При определении стабильности клеток учитывали не только aberrации по FISH-окрашенным, но и по контрольнокрашенным хромосомам

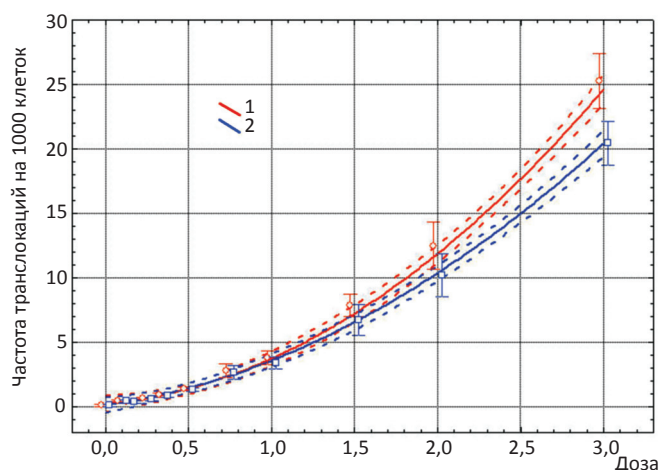


Рис. 4. Графики дозовых зависимостей (сплошные линии) с 95%-доверительными интервалами (пунктирные линии) частот транслокаций, выявленных с помощью трёхцветного FISH-метода для двух наборов ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й и 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом при анализе всех клеток (1 — красные линии) и стабильных клеток (2 — синие линии)
Fig. 4. Dose relation curves (solid lines) with 95% confidence intervals (dashed lines) of translocation frequencies detected using the three-color FISH method for two sets of DNA probes for 1, 4 and 12 and 2, 3 and 8 chromosome pairs in the analysis of all cells (1 — red lines) and stable cells (2 — blue lines)

хромосом уровни значимости равнялись 0,034 и 0,084, а для набора ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом — 0,070 и 0,040 соответственно.

Данные, полученные при использовании обоих наборов ДНК зондов, были объединены, и с помощью регрессионного анализа по методу наименьших квадратов были получены отдельные линейно-квадратичные дозовые зависимости для частот транслокаций во всех и в стабильных клетках:

$$Y = (0,23 \pm 0,33) + (1,19 \pm 1,69)D + (2,31 \pm 0,24)D^2, \quad (1)$$

где Y — частота транслокаций на 100 всех клеток (нестабильных и стабильных) при использовании обоих наборов ДНК-зондов, D — доза, Гр;

$$Y = (0,12 \pm 0,30) + (1,82 \pm 0,62)D + (1,65 \pm 0,21)D^2, \quad (2)$$

где Y — частота транслокаций на 100 стабильных клеток при использовании обоих наборов ДНК-зондов, D — доза, Гр.

Обе объединённые зависимости доза-эффект представлены графически на рис. 4.

В табл. 3 приведены данные, демонстрирующие относительное (среди выбранных трёхцветных пар хромосом) участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных двуцветных транслокациях с контрокрашенными хромосомами (суммарно независимо от дозы) отдельно для каждого донора и для всех них вместе. Для выявления возможных отличий между донорами с помощью критерия χ^2 было проведено соответствующее сравнение этих частот. Значимое отличие наблюдалось только между донорами 1 и 3 по хромосоме 2. В связи с единичностью указанного события был сделан вывод о его случайности, так как в остальных случаях не было существенных различий между донорами в от-

ношении участия разных пар хромосом в двуцветных FISH-контрокрашенных транслокациях (p варьировало от 0,116 до 1).

При дальнейшей статистической обработке показана существенность большего числа транслокаций с участием пар хромосом $1 > 4 > 12$ ($p < 0,0001$), а также для пар $2 > 8$ и $3 > 8$ ($p < 0,0001$). Только между парами 2 и 3 различия были незначимы ($p = 0,606$). При этом сравнение между эмпирическими и расчётными частотами участия отдельных пар хромосом в транслокациях, исходя из табличных соотношений содержания ДНК в выбранных парах хромосом, показало их примерное совпадение (p варьировало от 0,1110 до 0,6026) (для простоты были использованы сведения, приведенные для мужчин [1]). На основе этих данных был сделан вывод о соответствии вероятности участия отдельных использованных пар хромосом в радиационно-индуцированных транслокациях относительному содержанию в них ДНК. Это соответствует принятой сейчас гипотезе о пропорциональности вероятности индукции двойных разрывов ДНК её относительному содержанию в отдельных парах хромосом [1], хотя имеются работы, где эта точка зрения подвергается критике [5–7]. При этом нет единой точки зрения, какие хромосомы более радиочувствительны, а какие более радиорезистентны. Данное обстоятельство часто связывают с междонорскими различиями.

Таблица 3

Участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных двуцветных транслокациях с контрокрашенными хромосомами (суммарно независимо от дозы) при использовании трёхцветного FISH-метода

Participation of different FISH-stained chromosomes in radiation-induced bicolor translocations with counterstained chromosomes (in total, regardless of the dose) using the three-color FISH method

Транслокации по следующим парам FISH-окрашенных хромосом		Донор 1	Донор 2	Донор 3	Сумма
Набор ДНК-зондов к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом					
1	Число	135	142	154	431
	Доля, %	50,37	46,71	44,38	46,90
4	Число	79	88	120	287
	Доля, %	29,48	28,95	34,58	31,23
12	Число	54	74	73	201
	Доля, %	20,15	24,34	21,04	21,87
Сумма	Число	268	304	347	919
	Доля, %	100	100	100	100
Набор ДНК-зондов к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом					
2	Число	131	122	114	367
	Доля, %	41,99	37,65	33,63	37,64
3	Число	103	121	132	356
	Доля, %	33,01	37,35	38,94	36,51
8	Число	78	81	93	252
	Доля, %	25,00	25,00	27,43	25,85
Сумма	Число	312	324	339	975
	Доля, %	100	100	100	100

Исходным принципом получения кривых доза-эффект для частот радиационно-индуцированных транслокаций, регистрируемых FISH-методом, является их построение с помощью регрессионных методов по результатам облучения полученной путём венопункции крови здоровых доноров, как это делалось для уровней дицентриков при использовании классического метода окраски хромосом. В основе такого подхода является давно установленная одинаковая радиочувствительность хромосом лимфоцитов после воздействия на них ионизирующих излучений *in vivo* и *in vitro* [1]. В тех же рекомендациях МАГАТЭ высказано положение о необходимости в каждой лаборатории иметь свои собственные кривые доза-эффект для оценок дозы по FISH-окрашенным транслокациям. При построении этих кривых надо пользоваться тем же самым набором ДНК-зондов, который обычно применяются на практике для обследования реальных случаев возможного переоблучения индивидуумов, чтобы избежать пересчёта при получении оценок частоты геномных транслокаций. Такой подход позволяет устранить возникновение некоторой дополнительной неопределенности, сопутствующей этому процессу [1]. Таким образом, необходимость пересчёта в частоту геномных aberrаций возникает только при сравнении с данными других авторов, пользовавшихся иными наборами ДНК-зондов. Для коррекции экспериментально обнаруженных частот транслокаций к частоте на весь геном пользуются специальными формулами, учитывающими относительное содержание ДНК в соответствующих хромосомах и то, является ли используемый FISH-метод одноцветным, двухцветным или трёхцветным [1]. В табл. 1 и 2 показаны результаты такого пересчёта на основе полученных реальных частот транслокаций.

Имеются различные точки зрения относительно критериев выбора метафаз для цитогенетического анализа FISH-окрашенных препаратов. В идеальном виде подходящими для счёта считаются хорошо распластанные интактные полные метафазы с выраженными центромерами во всех хромосомах и яркой флуорохромной окраской для обнаружения обменов между разноцветными хромосомами [8, 9]. На практике полноту числа контрокрашенных хромосом учитывают с меньшей строгостью, хотя и стараются, чтобы в исследуемой метафазе количество всех хромосом было не меньше 40. При этом FISH-окрашенные пары хромосом должны присутствовать в своём полном объёме (насколько это позволяет разрешение метода) независимо от их участия в тех или иных перестройках [1, 10, 11]. Собственно говоря, в настоящей работе авторы и следовали данному подходу. В принципе показано, что учёт клеток с дефицитом окрашенного материала (например, вследствие делеции) приводит к аномально высокому уровню транслокаций, особенно, когда рассматриваются частоты, близкие к фоновым значениям [12, 13].

На основании результатов цитогенетического анализа препаратов, окрашенных классическим методом и с помощью G-бэндинга, было выдвинуто предположение, что дицентрики и реципрокные транслокации при действии ионизирующей радиации индуцируются с одинаковой частотой, т.е. при обра-

зовании двух разрывов в разных хромосомах образование асимметричного и симметричного обменов является равновероятным [14]. Однако в работах [15, 16] геномная частота транслокаций в культурах лимфоцитов периферической крови 2 доноров-женщин при использовании FISH-окрашенных наборов хромосом была больше, чем частота дицентриков после классической окраски хромосом. Были предложены следующие объяснения этому расхождению: 1) ошибочная идентификация дицентриков в качестве реципрокных транслокаций без использования центромерных FISH-проб [17]; 2) учёт всех транслокаций (реципрокных, терминальных и интерстициальных), а не только реципрокных [14].

В ряде работ необходимость использования центромерных проб для дифференциации транслокаций и дицентриков подвергается сомнению, т.к. для многих метафаз достаточно использовать фильтр контрокраски с целью ясной идентификации центромер [18, 19]. Более того, в статье [20] вообще высказывается мнение, что классическая идентификация центромеры по месту первичной перетяжки более надёжна, чем использование панцентромерных ДНК-проб, т.к. они в действительности метят не саму центромеру, а прицентромерный гетерохроматин. Соответственно, разрыв в этой области может приводить к неправильной классификации транслокаций и дицентриков.

Таким образом, из сказанного выше следует, что сейчас наиболее распространённой является точка зрения об одинаковой вероятности продукции симметричного и асимметричного обмена после индуцирования по одному разрыву в двух хромосомах. Тем более удивительными выглядят полученные нами данные. Как следует из табл. 1 и 2, уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Заметим, что центромеры, как и требуется, были в целом хорошо выражены при использовании фильтра контрокраски DAPI. С этими нашими данными полностью согласуются результаты, полученные в работе [10], также посвящённой построению цитогенетических кривых доза-эффект с помощью трёхцветного FISH-окрашивания после гамма-облучения периферической крови одного донора *in vitro*. В данном исследовании частота двухцветных дицентриков также была ниже уровня FISH-окрашенных транслокаций.

Возникает вопрос, насколько трёхцветное FISH-окрашивание увеличивает чувствительность метода по сравнению с его одноцветным вариантом? Ниже даны формулы, описывающие кривые доза-эффект при учёте всех наблюдаемых транслокаций и при учёте только транслокаций между FISH- и контрокрашенными хромосомами для обоих наборов ДНК-зондов:

$$Y = 0,210 + 1,337D + 2,352D^2, \quad (3)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,221 + 1,109D + 2,276D^2, \quad (4)$$

где Y — частота транслокаций только между FISH-и контрокрашенными хромосомами на 100 клеток (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,254 + 1,050D + 2,272D^2, \quad (5)$$

где Y — частота всех транслокаций на 100 клеток (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом), D — доза, Гр;

$$Y = 0,238 + 0,819D + 2,139D^2, \quad (6)$$

где Y — частота транслокаций только между FISH-и контрокрашенными хромосомами на 100 клеток (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом), D — доза, Гр.

Процедура вычитания показателей одной кривой из показателей другой даёт следующие зависимости только для транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом:

$$Y = -0,011 + 0,228D + 0,076D^2 \text{ (ДНК-зонды к 1-й, 4-й и 12-й парам хромосом)} \quad (7)$$

$$Y = 0,016 + 0,231D + 0,132D^2 \text{ (ДНК-зонды к 2-й, 3-й и 8-й парам хромосом)}. \quad (8)$$

Таким образом, количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом оказывается очень низким, что не способствует увеличению чувствительности FISH-метода ретроспективной оценки дозы по сравнению с его одноцветным вариантом.

В течение многих лет хромосомные обмены, включая транслокации, рассматривались как результат взаимодействия только двух хромосом [2]. Однако в последнее время было показано, что сложные аберрации, при образовании которых происходит три или более разрывов в двух или более хромосомах [1], оказываются достаточно распространёнными. Частота их появления и сложность увеличивается с дозой, особенно, при её уровнях более 2 Гр [21], но и при дозах менее 1 Гр и даже в необлучённых контролях они могут встречаться. Сложные обмены имеют практическим следствием усложнение биологической индикации дозы. То, что выглядело довольно простым процессом подсчета дицентриков или транслокаций, стало гораздо более сложным, так как исследователи столкнулись с важностью трактовки трехсторонних и более высокого уровня обменов по отношению к двухсторонним обменам. Было высказано мнение, что сложный характер реципрокных транслокаций может в отдалённый период приводить к их элиминации вследствие возникающего генетического дисбаланса при делении клеток и к соответствующему занижению ретроспективной оценки дозы [22]. К счастью, при низких дозах доля всех сложных обменов сравнительно невелика, но, по мнению, высказанному в статье [3], всё-таки не достаточно низка, чтобы полностью их игнорировать. В данной работе сложные транслокации были переведены в эквивалентное число простых транслокаций, основываясь на количестве разноцветных сочленений, как это было сделано в исследованиях [5, 6].

В то же время трёхцветный FISH-метод позволил зарегистрировать редкие, но интересные перестройки, включающие больше двух хромосом, которые не могли быть выявлены с помощью одноцветного FISH, хотя с формальной точки зрения они и не относятся к категории сложных транслокаций. Например, была обнаружена клетка (после облучения крови *in vitro* в дозе 0,35 Гр), в которой наблюдался обмен «по кругу» дистальными участками между тремя хромосомами: 1-й, 4-й и контрокрашенной, когда часть хромосомы 1 присоединилась к хромосоме 4, часть хромосомы 4 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 1 (рис. 5). В другой метафазе (после облучения в дозе 2,0 Гр) наблюдался аналогичный обмен дистальными участками между другими тремя хромосомами: 3-й, 8-й и контрокрашенной, т.е. часть хромосомы 3 присоединилась к хромосоме 8, часть хромосомы 8 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к 3-й хромосоме. В другой метафазе (после облучения крови *in vitro* в дозе 0,35 Гр) наблюдался аналогичный обмен дистальными участками между другими тремя хромосомами: 1, 4 и контрокрашенной, когда часть хромосомы 1 присоединилась к хромосоме 4, часть хромосомы 4 присоединилась к контрокрашенной хромосоме, а часть контрокрашенной хромосомы присоединилась к хромосоме 1. Встречались и другие клетки с подобными перестройками. В этих случаях происходит три разрыва в трёх хромосомах, что может быть зарегистрировано только при рассматриваемом трёхцветном FISH-методе. Возникает вопрос: сколько же транслокаций имеется

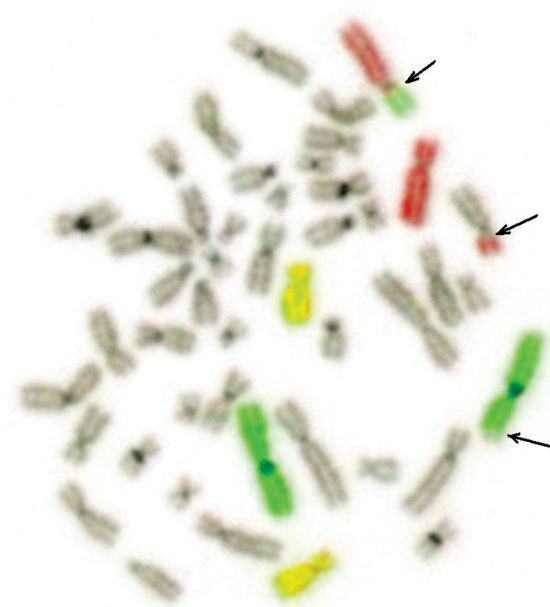


Рис. 5. Метафаза с FISH-окрашенными 1-й (зелёные), 4-й (красные) и 12-й-й (жёлтые) парами хромосом и последовательными транслокациями между 1, 4-й и контрокрашенной хромосомами (точки разрывов указаны стрелками)

Fig. 5. Metaphase with FISH-stained 1 (green), 4 (red) and 12 (yellow) pairs of chromosomes and sequential translocations between 1, 4 and counterstained chromosomes (break points are indicated by arrows)

в этих ситуациях? Действительно, при одной обычной транслокации происходит два разрыва в двух хромосомах, при двух независимых транслокациях — четыре разрыва в четырёх хромосомах. Поэтому мы посчитали возможным обозначить обнаруженный феномен как парадоксальным числом 1,5 транслокации, хотя в статье [10] авторы предлагают считать, что имеется 2 транслокации.

В рекомендациях МАГАТЭ [1] указывается, что хотя в настоящее время ретроспективное восстановление дозы по частоте транслокаций в стабильных клетках является общепринятым методом, однако имеются ограничения. По-видимому, это хороший подход для случаев пролонгированного облучения в низкой дозе при преобладании в уравнении дозовой зависимости линейного члена. После облучения в высокой острой дозе ограничение анализа лишь стабильными клетками может приводить к недооценке её величины, т.к. количество транслокаций в нестабильных клетках возрастает вместе с числом сложных аберраций, да и частота клеток, не содержащих нестабильные перестройки хромосом, при росте дозы становится всё меньше и меньше. Таким образом, использование одной из двух кривых, представленных на рис. 1, оказывается вопросом выбора в каждом отдельном случае.

Необходимо также отметить, что в нашем исследовании после облучения *in vitro* при дозах более 1 Гр наблюдалась в целом (хотя бы и в виде тенденции) более высокая частота транслокаций во всех клетках по сравнению с их регистрацией в только стабильных клетках, что несколько удивительно и пока не объяснимо. С нашей точки зрения, более логичной выглядела бы другая ситуация, исходя из индуцированного количества разрывов, реализующихся в виде стабиль-

ных или нестабильных хромосомных аберраций. В работе [11] после облучения *in vitro* частоты простых транслокаций в стабильных и нестабильных клетках не различались, но и верхняя дозовая граница составляла 1 Гр.

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования были получены кривые доза-эффект для транслокаций. Они были построены по результатам цитогенетического анализа с помощью трёхцветного FISH-метода культур лимфоцитов периферической крови трёх здоровых доноров после γ -облучения *in vitro* в дозах от 0,1 до 3 Гр. При этом использовались два разных набора ДНК-зондов к 1-й, 4-й, 12-й и 2-й, 3-й, 8-й парам хромосом. Суммарное относительное содержание ДНК в этих выбранных группах хромосом практически не отличается друг от друга. Схожими оказались и полученные кривые доза-эффект. При этом цитогенетический анализ только стабильных метафазных клеток при наиболее высоких дозах 2 и 3 Гр выявлял тенденцию к регистрации более низких уровней транслокаций, чем при анализе всех клеток (нестабильных и стабильных). Уровни дицентриков, образованных с участием FISH-окрашенных хромосом, были существенно ниже числа наблюдаемых транслокаций. Количественный вклад транслокаций между FISH-окрашенными парами хромосом в целом оказался очень низким, что явно не способствует увеличению чувствительности FISH-метода ретроспективной оценки дозы по сравнению с его одноцветным вариантом. В то же время трёхцветная FISH-окраска позволяет выявлять такие варианты хромосомных перестроек, которые не регистрируются с помощью одноцветного FISH-метода.

Three-Color FISH Method: Dose-Effect Curves for Translocations in Peripheral Blood Lymphocyte Cultures after Gamma-Irradiation *in vitro*

V.Yu. Nugis¹, G.P. Snigiryova², E.E. Lomonosova¹, M.G. Kozlova¹, V.A. Nikitina¹

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

E-mail: nugisvju@list.ru

ABSTRACT

Purpose: Plotting dose-effect curves for translocations identified using the tricolor FISH method based on the results of cytogenetic analysis of cultures of peripheral blood lymphocytes of healthy donors after *in vitro* gamma irradiation.

Material and methods: Venous blood was obtained from three donors (2 men and 1 woman aged from 28 to 41 years) and subjected to *in vitro* gamma irradiation from a ⁶⁰Co source at doses of 0.10; 0.15; 0.25; 0.35; 0.50; 0.75; 1.00; 1.50; 2.00 and 3.00 Gy at 37 °C (dose rate 0.5 Gy / min). For tricolor FISH staining, two different sets of DNA probes were used for chromosome pairs 1, 4, 12 and 2, 3, 8. Metaphases with a quasi-diploid number of chromosomes (40–46) and a complete set of all FISH-stained chromosomes, taking into account their total length, were selected for analysis. Differentiation of stable and unstable cells was also carried out. In the cytogenetic analysis, traditional terminology was used with the designation of translocations as reciprocal (complete, two-sided), non-reciprocal (terminal, incomplete, or unilateral), or interstitial.

Results: The obtained numerical data were used to compare the statistically frequencies of FISH-recorded translocations when using different sets of DNA probes, when calculating of chromosome aberrations were in all (unstable and stable) and stable metaphase cells, when comparing of the frequencies of FISH-recorded translocations and dicentrics, and assessing of the contribution of the level of translocations between FISH-stained chromosome pairs in the total translocation frequency. Cytogenetic analysis of only stable metaphase cells revealed a tendency to register lower levels of translocations than when analyzing all cells (unstable and stable), at the highest doses of 2 and 3 Gy. The levels of dicentrics formed with the participation of FISH-stained chromosomes were significantly lower than the number of observed translocations. The quantitative contribution of translocations between FISH-stained pairs of chromosomes turned out to be very low, which clearly does not contribute to an increase in the sensitivity of the FISH method of retrospective dose estimation as compared to its one-color version. At the

same time, the three-color FISH-staining makes it possible to identify such variants of chromosomal rearrangements that are not recorded using the one-color FISH method.

Conclusion: The plotted dose–effect curves generally corresponded to the linear-quadratic form. Dose dependences obtained for translocations using two different selected tricolor sets of DNA probes did not differ statistically significantly.

Key words: peripheral blood, lymphocytes culture, gamma-irradiation *in vitro*, three-color FISH method, translocations, dose–effect curves

For citation: Nugis VYu, Snigiryova GP, Lomonosova EE, Kozlova MG, Nikitina VA. Three-Color FISH Method: Dose–Effect Curves for Translocations in Peripheral Blood Lymphocyte Cultures after Gamma-Irradiation *in vitro*. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):12-20 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-12-20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 240 p.
2. Tucker JD. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2008;659(3):211-20. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.04.001.
3. Kodama Y, Nakano M, Ohtaki K, Delongchamp R, Awa AA, Nakamura N. Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol*. 1997;71(1):35-9. DOI: 10.1080/095530097144391.
4. Boei JJWA, Natarajan AT. Combined use of a chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations. *Int J Radiat Biol*. 1998;73(2):125-33. DOI: 10.1080/095530098142491.
5. Pouzoulet F, Roch-Lefevre S, Giraudet AL, Vaurijoux A, Voisin Pa, Buard V, et al. Monitoring translocations by m-FISH and three-color FISH painting techniques: a study of two radiotherapy patients. *J Radiat Res*. 2007;48(5):425-34. DOI: 10.1269/jrr.07013.
6. Ramadhani D, Purnami S, Yoshida M. Comparison of radiosensitivity of human chromosomes 1, 2 and 4 from one healthy donor. *Atom Indonesia*. 2006;42(2):71-7. DOI: 10.17146/aij.2016.505.
7. Sommer S, Buraczewska I, Wojewodzka M, Bouzyk E, Szumiel I, Wojcik A. The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors. *Int J Radiat Biol*. 2005;81(10):741-9. DOI: 10.1080/09553000500499381.
8. Sigurdson AJ, Ha M, Hauptmann M, Bhatti P, Sram RJ, Beskid O, et al. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat Res*. 2008;652(2):112-21. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.01.005.
9. Liu Q-J, Lu X, Zhao X-T, Feng J-B, Lü Yu-M, Jiang En-H, et al. Assessment of retrospective dose estimation, with fluorescence *in situ* hybridization (FISH), of six victims previously exposed to accidental ionizing radiation. *Mutat Res / Genet Toxicol Environ Mutagenesis*. 2014;759:1-8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.07.016.
10. Suto Y, Akiyama M, Noda T, Hirai M. Construction of a cytogenetic dose–response curve for low-dose range gamma-irradiation in human peripheral blood lymphocytes using three-color FISH. *Mutat Res / Genet Toxicol Environ Mutagenesis*. 2015;794:32-8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.002.
11. Goh VST, Fujishima Y, Abe Y, Sakai A, Yoshida MA, Ariyoshi K, et al. Construction of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) translocation dose–response calibration curve with multiple donor data sets using R, based on ISO 20046:2019 recommendations. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(12):1668-84. DOI: 10.1080/09553002.2019.1664788.
12. Edwards AA, Maznik N, Moquet J, P. Hone; Vinnikov V, Lloyd D, Cox R. Choosing metaphases for biological dosimetry by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Radiat Res*. 2002;157(4):469-71. DOI: 10.1667/0033-7587(2002)157[0469:CMFBDB]2.0.CO;2.
13. Lloyd DC, Lucas JN, Edwards AA, Deng W, Valente E, Hone PA, Moquet JE. A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations of Namibian uranium miners. *Radiat Res*. 2001;155(6):809-17. DOI: 10.1667/0033-7587(2001)155[0809:astvar]2.0.co;2.
14. Natarajan AT, Balajee AS, Boei JJWA, Darroudi F, Dominguez I, Hande MP, et al. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat Res*. 1996;372(2):247-58. DOI: 10.1016/s0027-5107(96)00144-3.
15. Natarajan AT, Vyas RC, Darroudi F, Vermeulen F. Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int J Radiat Biol*. 1992;61(2):11-8. DOI: 10.1080/09553009214550821.
16. Lucas J, Tenjin T, Straume T, Pintel D, Moore II D, Litt M, et al. Rapid determination of human chromosome translocation frequency using a pair of chromosome-specific DNA probes. *Int J Radiat Biol*. 1989;56(1):35-44. DOI: 10.1080/09553008914551161.
17. Straume T, Lucas JN. A comparison of the yields of translocations and dicentric chromosomes measured using fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol*. 1993;64(2):185-7. DOI: 10.1080/09553009314551281.
18. Tucker JD, Lee DA, Moore II DH. Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol*. 1995;67(1):19-28. DOI: 10.1080/09553009514550031.
19. Sorokine-Durm I, Durand V, Delbos M, Le Baron L, Roy L, Voisin P. A french view on FISH painting as a biodosimeter. *Radiat Protect Dosimetry*. 2000;88(1):35-44. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033017.
20. Tucker JD. Evaluation of chromosome translocations by FISH for radiation biodosimetry: a view from one laboratory. *Radiat Protect Dosimetry*. 2000;88(1):87-92. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033025.
21. Tucker JD, Ramsey MJ, Lee DA, Minkler JL. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral blood lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol*. 1993;64(1):127-37. DOI: 10.1080/09553009314551081.
22. Savage JRK, Papworth DG, Bauchinger M, Natarajan AT, Pantelias GE, Griffin CS, et al. Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction. *Radiat Protect Dosimetry*. 2000;88(1):69-76. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a033022.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 28.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 28.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Nugis V.Yu. <http://orcid.org/0000-0001-7396-0246>.

Snigiryova G.P. <https://orcid.org/0000-0002-2584-802X>.

Lomonosova E.E. <https://orcid.org/0000-0003-3739-4261>.

Kozlova M.G. <http://orcid.org/0000-0001-8159-0513>.

Nikitina V.A. <http://orcid.org/0000-0002-3150-7686>.

А.В. Аклеев^{1,2}**ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО ЛУЧЕВОГО СИНДРОМА НА РАННЕЙ СТАДИИ**¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, Челябинск² Челябинский государственный университет, Челябинск

Контактное лицо: Аклеев Александр Васильевич, akleyev@urcgm.ru

РЕФЕРАТ

Цель работы: Идентифицировать и проанализировать ранние симптомы хронического лучевого синдрома (ХЛС), имеющие важное значение для диагностики этой редкой лучевой патологии человека.

Материал и методы: По данным многолетнего клинического наблюдения за жителями прибрежных сел реки Течи представлены результаты ретроспективного анализа ранних клинических проявлений ХЛС. Средние значения доз постнатального облучения красного костного мозга (ККМ) у пациентов с ХЛС, полученные с использованием системы TRDS-2016D, составили $698,8 \pm 18,2$ мГр, а максимальные достигали 3 603,9 мГр.

Результаты: Клиническая картина ХЛС на начальной стадии характеризовалась комплексом неспецифических изменений, который включал гематологические, иммунные, неврологические и эндокринные изменения, а также нарушения функции ряда внутренних органов. Вышеописанные симптомы ХЛС развивались в определенной последовательности и зависели от мощности дозы и поглощенной дозы в органах. До формирования развернутой клинической картины ХЛС у пациентов отмечалось снижение порогов обонятельного и вкусового анализаторов, вибрационной чувствительности и изменения системного иммунитета. Начальные изменения ХЛС были умеренно выраженными и носили транзиторный характер. Анализ ранних симптомов ХЛС позволяет предположить, что начальная стадия ХЛС представляет собой дисрегуляторную патологию, в основе которой первично лежат радиационно-индуцированные нарушения иммуногемопоеза, нервной и эндокринной систем. Висцеральные изменения на ранней стадии ХЛС имеют вторичный функциональный характер и после прекращения облучения нивелируются. В условиях продолжающегося облучения в дозах, достаточных для развития морфологических изменений в органах и тканях (дистрофия, фиброз, гипоплазия и др.), течение ХЛС приобретает прогрессирующий необратимый характер.

Заключение: Показано, что диагностика ХЛС на начальной стадии представляет большие сложности; ключевое значение имеет анализ зависимости динамики развития специфического комплекса симптомов, характерного для ХЛС, от мощности дозы и поглощенных органных доз.

Ключевые слова: хронический лучевой синдром, диагностика, симптомы, доза, мощность дозы

Для цитирования: Аклеев А.В. Диагностика хронического лучевого синдрома на ранней стадии. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):21-8.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-21-28

Введение

Клинические проявления сформированной в результате длительного облучения человека хронической лучевой болезни были описаны выдающимися отечественными клиницистами А.К. Гуськовой [1], Н.А. Куршаковым [2], И.С. Глазуновым [3], Г.Д. Байсоголовым [4], П.М. Киреевым [5] и др. еще в 1950-х гг. Показано, что изменения гемопоэза занимают в клинической картине заболевания ведущее место и по времени совпадают с периодом формирования основной дозы облучения. По мнению Г.Д. Байсоголова, именно гематологические изменения определяют степень тяжести и прогноз заболевания [4]. В свете современных радиобиологических представлений хроническую лучевую болезнь можно определить как клинический синдром, который характеризуется неспецифическими полиорганными нарушениями, возникающими у человека вследствие общего длительного (месяцы – годы) воздействия ионизирующей радиации (ИР) в дозах, превышающих пороговые значения для развития тканевых реакций в критических системах (иммуногемопоез, нервная и эндокринная) [6, 7].

Однако симптомы хронического лучевого синдрома (ХЛС) в период его формирования остаются малоисследованными до настоящего времени. Опыт медицинского наблюдения за людьми, подвергшимися хроническому радиационному воздействию, показал, что диагностика синдрома на ранней стадии представляет большие сложности, так как ХЛС является редким и малоизвестным врачам общей практики за-

болеванием, а также вследствие длительного латентного периода, который может составлять несколько лет, и отсутствия у синдрома патогномичных признаков [2, 5].

В настоящее время диагностика ХЛС на ранних стадиях представляет значительный интерес, так как позволяет обеспечить безопасность космонавтов при выполнении длительных космических миссий. В этой связи большой интерес представляют результаты многолетнего наблюдения за жителями районов Уральского региона Российской Федерации, которые подверглись хроническому воздействию ИР вследствие сброса жидких радиоактивных отходов (ЖРО) ПО «Маяк» в реку Течу [6]. Медицинское наблюдение за лицами с ХЛС проводится с 1951 г. в клинике Уральского научно-практического центра радиационной медицины ФМБА России. Целью работы был ретроспективный анализ симптомов ХЛС в период его формирования.

По результатам многолетнего медицинского наблюдения ХЛС преимущественно легкой степени тяжести был диагностирован у 940 сельских жителей, проживавших вдоль реки, которые подверглись многолетнему сочетанному воздействию внешнего γ - и внутреннего облучений. Критическим органом по дозе облучения являлся красный костный мозг (ККМ). Наибольший вклад во внутреннее облучение вносили $^{89,90}\text{Sr}$ и ^{137}Cs , которые поступали в организм людей с речной водой и продуктами питания местного производства (овощи, мясо, молоко, рыба и др.) [6, 7]. Основной вклад в формирование ХЛС вносило

внешнее γ -облучение и наиболее часто ХЛС диагностировался у жителей сел, расположенных близко к месту сброса ЖРО, где отмечались максимальные мощности дозы γ -излучения [6]. Наибольшее значение для развития ХЛС имели аварийные сбросы в октябре 1951 г. (суммарная активность составила около 1,23 млн Ки), которые обеспечили поступление в реку более 60 % таких относительно долгоживущих радионуклидов, как ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{147}Pr , ^{125}Sb , ^{155}Eu и других [8].

Результаты индивидуализированной оценки доз облучения ККМ показывают, что они в основном находились на уровне пороговых доз, вызывающих ХЛС легкой степени тяжести [7, 10]. Средние значения дозы облучения ККМ, выполненные на основе дозиметрической системы реки Течи (TRDS-2016D) [11] у 936 человек, перенесших ХЛС, составили $698,8 \pm 18,2$ мГр (максимальная индивидуальная доза достигала 3603,9 мГр). Средние дозы облучения ККМ у пациентов на время диагностики ХЛС были несколько ниже и составляли $438,7 \pm 11,7$ мГр (максимальное значение — 2109,1 мГр). ХЛС был зарегистрирован у 614 женщин (65,3 %) и 326 мужчин (34,7 %). Наиболее часто ХЛС диагностировалась в трудоспособном возрасте 20–49 лет — 542 случая (57,7 %). В возрасте до 20 лет было зарегистрировано 242 случая (25,7 %), а у лиц 70 лет и старше — только 7 случаев (0,7 %) [6, 7, 10].

Период формирования ХЛС

Продолжительность латентного периода у жителей прибрежных сел определялась мощностью дозы, поглощенной дозой облучения ККМ и радиочувствительностью индивида. Чем выше была мощность, тем короче была продолжительность латентного периода. ХЛС у взрослых жителей прибрежных сел, как правило, диагностировался через 4–5 лет после начала радиационного воздействия [9, 12]. У жителей с. Метлино, расположенного наиболее близко к месту сброса ЖРО, в котором отмечались наибольшие мощности дозы от внешнего γ -излучения, латентный период был наиболее коротким и составлял 1–2 года. Более чувствительными к воздействию радиации являлись дети, у которых признаки ХЛС появлялись более рано, чем у взрослых [9].

Для ХЛС было характерно постепенное развитие заболевания. Период формирования ХЛС занимал несколько лет и с небольшой задержкой во времени совпадал с формированием поглощенной дозы в ККМ. Он также включал ближайшие сроки (обычно до 1 года) после прекращения облучения или значительного снижения мощности дозы. В это время манифестировали основные симптомы заболевания и формировалась развернутая клиническая картина синдрома. Степень выраженности реакций органов (тканей) определялась мощностью дозы и поглощенной органной дозой. В условиях продолжающегося облучения патологический процесс носил характер постепенного углубления характерных для ХЛС изменений в регуляторных системах (иммуногемопоз, нервная и эндокринная) и внутренних органах. Волнообразность течения заболевания являлась другой его характерной особенностью. Состояние здоровья пациентов с ХЛС претерпевало периодические

изменения, когда периоды улучшения и ухудшения сменяли друг друга. Как отмечалось, сложность диагностики ХЛС на ранней стадии в значительной мере определялась неспецифичностью клинических проявлений. Однако достаточно типичным для ранних симптомов ХЛС являлось сочетание реакций критических систем (иммунитета и гемопоза) с функциональными нарушениями органов чувств, нервной системы и внутренних органов, которые предшествовали структурным изменениям тканей [6, 7, 10].

Полиорганные функциональные изменения в кроветворной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и других системах, обусловленные нарушением регуляции со стороны нервной, эндокринной и иммунной систем, регистрировались уже в периоде формирования. Такие ранние признаки ХЛС, как артериальная гипотензия или нарушение секреторной функции желудка и моторики желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), имели функциональный характер и были обусловлены нарушениями регуляторной функции нервной и эндокринной систем. Начальные изменения клеточного состава периферической крови также были обусловлены функциональными изменениями пролиферации и созревания костномозговых клеток, включая стволовые [6, 7, 13].

Больные с ХЛС на начальной стадии предъявляли жалобы головные боли преимущественно лобно-височной локализации, несистемное головокружение, общую слабость, боли в костях, раздражительность, неприятные ощущения и боли в области сердца, желудка, кишечника, снижение аппетита, неустойчивость стула и повышенную потливость [14]. Наиболее ранними признаками ХЛС являлись нарушения органов чувств и иммунитета, которые регистрировались до формирования типичных гематологических изменений. Реже регистрировались симптомы вегетативной дисфункции [12, 15]. Вышеуказанные реакции на хроническое облучение в условиях прекращения облучения достаточно быстро регрессировали без развития ХЛС.

Органы чувств

У 89,7 % обследованных жителей прибрежных сел в первые годы после начала облучения и до развития ХЛС отмечалось снижение обоняния. Чаще всего обнаруживалась гипосмия на тимол и камфору, реже на розмарин и деготь. В отдельных случаях имело место нарушение восприятия всех вышеуказанных раздражающих веществ. Наиболее выраженное снижение обоняния отмечалось в первые пять лет после начала облучения, но по мере уменьшения мощности дозы порог обоняния восстанавливался [12, 14, 15].

У 62,0 % облученных лиц в это же время наблюдалось снижение вкуса [14]. У большинства обследованных лиц гипогейзия имела диссоциированный характер. Чаще всего гипогейзия отмечалась на «горькое» и «сладкое», реже на «кислое» и «солёное». Снижение вкуса на все применяемые вкусовые вещества наблюдалось редко. Количество людей с гипогейзией по мере снижения мощности дозы облучения также уменьшалось [12, 15].

Исследование функционального состояния вестибулярного аппарата методом калоризации позволило

отметить снижение вестибулярной возбудимости, которое проявлялось отсутствием вестибуло-окулярной реакции на температурный раздражитель (вода при температуре 25 °C), укорочением длительности физиологического нистагма (при температуре воды 19 °C) и увеличением латентного периода нистагма [12, 15, 16]. Вращение в кресле Бараньи позволило выявить у облученных людей выраженные вестибулярные нарушения, которые проявлялись как в снижении, так и в повышении возбудимости вестибулярного аппарата. После вращения часто отмечалась выраженная вегетативная реакция в виде тошноты, головокружения, побледнения и учащения числа сердечных сокращений [12, 16].

У облученных людей до развития ХЛС также выявлялось снижение вибрационной чувствительности. Гипопаллестезия регистрировалось у 34,7 % облученных людей, тогда как среди необлученных людей таких случаев не отмечалось [14, 16, 17].

Нервная система

Функциональные изменения со стороны нервной системы отмечались уже на начальной стадии ХЛС в виде различных симптомов вегетативной дисфункции, а позднее развивался астенический синдром. В дебюте ХЛС выявлялась активация преимущественно симпатического отдела вегетативной нервной системы.

В неврологическом статусе больных отмечались: нестойкие глазодвигательные расстройства (ослабление конвергенции, недоведение глазных яблок до крайних положений, патологический нистагм), неустойчивость в позе Ромберга, тремор пальцев вытянутых рук, повышение сухожильных и периостальных рефлексов, нарушение высшей нервной деятельности [12, 15]. Изменения биоэлектрической деятельности коры у людей с вегетативной дисфункцией характеризовались неустойчивостью основных нервных процессов, которое проявлялось непостоянством характера электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и лабильностью всех физиологических показателей [16, 17].

Кроме вышеописанных нарушений функции обонятельного и вкусового анализаторов, другими ранними проявлениями вегетативной дисфункции являлись сосудистые реакции кожи с преобладанием вазодилатации, понижение тонуса капилляров, лабильность числа сердечных сокращений и артериального давления. Симптомы вегетативной дисфункции при ХЛС включали транзиторные вегетативные нарушения функции внутренних и эндокринных органов, а также обменных процессов [12, 14–17].

По мере прогрессирования ХЛС у больных появлялись признаки астении. Астения наблюдалась уже при легкой степени тяжести ХЛС и проявлялась в выраженной умственной и физической утомляемости пациентов. Больные предъявляли жалобы на постепенно нарастающую вялость, общую слабость, снижение работоспособности, быструю утомляемость, нарушение сна, снижение памяти, боли в костях и другие. Больные не справлялись с выполнением повседневной работы в домашнем хозяйстве и производственных условиях. Процесс обучения в общеобразовательных и специальных учреждениях был

затруднен вследствие ухудшения внимания и памяти. Отмечались разнообразные нарушения сна: поверхностный сон, длительные периоды засыпания и пробуждения, иногда инверсия сна (бессонница ночью и сонливость днём). Позже появлялась раздражительность, эмоциональная лабильность, депрессивное состояние с тревожным компонентом. Головная боль постепенно приобретала постоянный характер и локализовалась преимущественно в лобно-височной области. Несмотря на ухудшение самочувствия, критическое отношение пациентов к своему состоянию здоровья сохранялось [12, 14–17].

При обследовании больных отмечалась физическая слабость и истощаемость после минимальных физических нагрузок, статическая атаксия при удовлетворительной координации движений, тремор пальцев вытянутых рук, оживление сухожильных и периостальных рефлексов по функциональному типу, повышенная истощаемость брюшных рефлексов. ЭЭГ-ритмы в покое сохранялись в норме, но отмечались выраженные изменения биоэлектрической активности головного мозга на функциональные нагрузки (открывание и закрывание глаз, учащенное дыхание), на световые и звуковые раздражители и другую стимуляцию в виде замедления реакции и восстановительного периода [16, 17].

Иммунная система

Формирование ХЛС сопровождалось угнетением врожденного иммунитета, аллергической перестройкой организма, выражающейся в появлении неспецифических кожных аллергических реакций, и изменением титра гетерофильных антител. Необходимо отметить, что состояние адаптивного иммунитета не исследовалось. У облученных людей наблюдалось снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови и слюны, содержания лизоцима в слюне, а также угнеталась продукция антител после вакцинации [12, 15]. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов крови по отношению к живой культуре белого стафилококка и нейтрофилов слюны по отношению к аутофлоре ротовой полости наблюдалось до развития типичных для ХЛС гематологических изменений. Изменения иммунитета прогрессировали с увеличением дозы облучения ККМ и по мере прогрессирования гематологических и неврологических проявлений ХЛС. Содержание лизоцима в слюне коррелировало с выраженностью цитопении. Снижение лизоцима было наиболее выраженным у пациентов с низким количеством нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови [15].

Нарушение системного иммунитета проявлялось также в увеличении количества аутомикрофлоры кожи и слизистых оболочек организма, нередко сочетающееся с появлением среди представителей облигатной микрофлоры патогенных микроорганизмов. Выраженное угнетение показателей системного иммунитета имело место при годовой дозе облучения ККМ 0,3–0,5 Гр и выше. С увеличением поглощенной дозы на ККМ изменения аутомикрофлоры становились более выраженными и наблюдались у большего числа людей. Наиболее часто иммуносупрессия реги-

стрировалась в зрелом и пожилом возрасте, реже — у молодых. Так, у лиц со средней дозой облучения ККМ около 0,85 Гр в возрасте старше 30 лет угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов крови встречалось в 54 % случаев, а у более молодых — лишь в 17 % [18].

Кроветворная система

В периферической крови больных ХЛС отмечено снижение числа лейкоцитов и тромбоцитов, приводящее к развитию лейкопений и тромбоцитопений, которые достигали своего максимума в 1951–1956 гг. Цитопении, как правило, были умеренно выраженными и носили транзиторный характер; число лейкоцитов снижалось до $(3,5-4,0) \times 10^9/\text{л}$, а тромбоцитов до $(150-190) \times 10^9/\text{л}$. Низкий уровень лейкоцитов в периферической крови был обусловлен снижением числа лимфоцитов и нейтрофилов. Снижение числа лимфоцитов у лиц с ХЛС в основном регистрировалось в 1951–1953 гг., когда отмечались наибольшие дозы облучения не только ККМ, но и тимуса, периферических лимфоидных органов. Снижение числа нейтрофильных гранулоцитов было более выраженным, стойким и сопровождалось «левым» сдвигом в лейкоцитарной формуле крови [6, 7, 12, 14, 15, 19]. Снижение содержания эритроцитов и гемоглобина наблюдалось преимущественно у женщин с ХЛС [6].

Важно подчеркнуть, что в начальной стадии ХЛС у больных не отмечалось выраженного угнетения костномозгового кроветворения, а цитопении были обусловлены, преимущественно, функциональными изменениями костномозговых клеток. Количество миелокариоцитов, как правило, не изменялось, но отмечались задержка дифференцировки гранулоцитов на стадии материнского миелоцита, повышение митотической активности эритробластов и снижение числа функционально активных мегакариоцитов [6, 7, 12, 15, 19]. Отчетливое ускорение созревания эритроидных клеток на фоне повышения их пролиферативной активности было направлено на сохранение нормального уровня эритроцитов в периферической крови. В ранние сроки также отмечено повышение уровня aberrантных костномозговых нейтрофильных и эритроидных клеток как на стадии митоза (преимущественно клампинг хромосом), так и в интерфазе (преимущественно гигантские клетки и двуядерные клетки). Было отмечено, что пролиферативная активность костномозговых гранулоцитов является недостаточной для компенсации задержки созревания и повреждений гранулоцитов. Можно полагать, что гранулоцитопения, которая является наиболее характерным гематологическим признаком ранней стадии ХЛС, при отсутствии значительного снижения количества зрелых гранулоцитов в ККМ может свидетельствовать о функциональной неполноценности и уменьшении продолжительности жизни зрелых сегментоядерных нейтрофилов [6, 7].

Сердечно-сосудистая система

У пациентов с ХЛС легкой степени тяжести в сочетании со снижением сосудистого тонуса отмечались функциональные изменения миокарда, что проявлялось приглушенностью сердечных тонов,

систолическим шумом на верхушке, нарушениями ритма в виде синусовой аритмии и экстрасистолии, лабильностью пульса и артериального давления с склонностью к гипотензии, изменениями на ЭКГ (лабильность величины зубцов, особенно Т-зубца), снижением скорости распространения пульсовой волны и тонуса капилляров [12, 15, 16]. Гемодинамические изменения по данным реоэнцефалографии, реовазографии и других исследований регистрировались в сосудах головного мозга, конечностей, кожи, глазного дна и свидетельствовали о наличии дистонии центральных и периферических сосудов с тенденцией к снижению тонуса артерий и вен. При капилляроскопии обнаруживалось расширение капилляров и нарушение кровотока в них [16, 17]. У больных на ранней стадии ХЛС наблюдался патологический характер местного дермографизма (снижение его порога, укорочение скрытого периода, стойкий красный разлитой характер) и усиленная гистаминовая реакция кожи. Нарушение регуляции сосудов кожи и потовых желез у больных с вегетативной дисфункцией являлось основной причиной изменения кожной топографии и гипергидроза [12, 15, 16].

Пищеварительная система

В период формирования ХЛС со стороны органов пищеварения выявлялись преимущественно нестойкие функциональные изменения секреторной и моторной деятельности ЖКТ и пищеварительной системы в целом. Начальное гиперацидное состояние секреторной функции желудка постепенно сменялось гипоацидным. В кишечнике отмечалось нарушение секреции энтерокиназы и щелочной фосфатазы, а в поджелудочной железе — липазы, трипсина и амилазы. Содержание амилазы, как правило, оставалось в пределах нормы. Моторные расстройства проявлялись как ускорением, так и замедлением продвижения желудочно-кишечного содержимого [12, 15, 16].

Функциональное исследование печени выявляло снижение ее антитоксической функции. Положительная реакция Таката-Ара и сдвиг вправо в пробе Вельтмана косвенно свидетельствовали о наличии хронического воспалительного процесса в печени. Содержание холестерина в крови находилось в пределах нормы [16, 17].

Высокая частота диспепсических расстройств в ранние сроки ХЛС у жителей прибрежных сел реки Течи объяснялась как непосредственным действием радионуклидов на слизистые оболочки ЖКТ и органы пищеварения, так и нарушением нервной регуляции их функции [12]. Изменения со стороны пищеварительной системы у больных ХЛС легкой степени тяжести, как правило, сопровождались признаками вегетативной дистонии и носили характер лёгких функциональных сдвигов, что свидетельствовало о радиационно-индуцированном нарушении регуляции со стороны нервной системы. Однако нельзя исключить и влияние химических соединений (нитрат и ацетат натрия, трехвалентный хром, марганец, гидроокись железа и др.) на пищеварительную систему местных жителей, которые поступали в речную воду в результате сбросов ЖРО [20, 21].

Мочеполовая система

У больных ХЛС с выраженными симптомами вегетативной дисфункции отмечалась лабильность функции почек с тенденцией к снижению почечного кровотока, клубочковой фильтрации, канальцевой реабсорбции и повышению проницаемости мембран клубочков для белков плазмы. Изменения функций почек, как правило, не были выраженными и не отражались на экскреторной функции почек. Вышеуказанные нарушения носили транзиторный характер и часто в случаях повторного исследования регистрировались нормальные показатели. Хотя у пациентов отсутствовали клинически значимые нарушения почечной недостаточности, при проведении функциональных проб по Зимницкому, Ребергу (клиренс эндогенного креатинина) и с диодрастом выявлялись изменения. В некоторых случаях в общем анализе мочи обнаруживался белок и сахар. Уровень остаточного азота в крови больных на начальной стадии ХЛС находился в пределах нормы [16, 17].

У некоторых женщин на начальной стадии ХЛС отмечалось нарушение менструального цикла и соотношения отдельных фракций половых гормонов. Альгодисменорея, полименорея, гиперменорея или гипоменорея чаще наблюдались у молодых женщин. Суммарное содержание эстрогенов, а также эстрадиола, эстрогена и эстриола в большинстве случаев у женщин на ранней стадии ХЛС было на уровне нижней границы нормы. Соотношение фракции эстрогенов отличалось неустойчивостью [12, 15, 17, 22].

Эндокринная система и обмен веществ

У больных в период формирования ХЛС на фоне вегетативной дисфункции наблюдалось повышение функции щитовидной железы, снижение функциональной активности коры надпочечников и половых желез [12, 15–17]. Наиболее часто эндокринные нарушения отмечались у лиц с ХЛС, облучение которых началось в раннем детском возрасте [23].

При исследовании обмена веществ у больных на ранней стадии ХЛС редко наблюдались выраженные изменения со стороны основного и углеводного обмена. Основной обмен у большей части больных имел тенденцию к повышению. Изменения углеводного обмена проявлялись в снижении уровня сахара в крови, повышении содержания молочной кислоты, а также в нарушении толерантности к глюкозе. Нарушения минерального и белкового обмена наблюдались в единичных случаях. Отчётливых изменений в содержании ионов кальция (Ca^{2+}) и калия (K^+) в крови у больных на начальной стадии ХЛС также не было выявлено. У отдельных больных отмечалось незначительное повышение концентрации K^+ и снижение Ca^{2+} . Содержание хлоридов в крови находилось в пределах нормы [17].

Костная система

Боли в костях, преимущественно в проксимальных и дистальных отделах большеберцовых костей, регистрировались у 8,1 % облученных людей, и по мере прогрессирования ХЛС их частота и выраженность существенно нарастала [16]. При пальпации отмечалась резкая болезненность периоста и снижение

вибрационной чувствительности. В патогенезе остеопалгии на ранней стадии ХЛС основная роль отводится сосудистым нарушениям. На более поздних стадиях ХЛС были отмечены дистрофические изменения костной ткани (гибель остецитов, расширение просвета гаверсовых каналов, образование массивных костных балок, беспорядочное костеобразование) и сосудов [16, 17].

Обсуждение и заключение

Как было показано выше, начальные проявления ХЛС у жителей прибрежных сел реки Течи с преимущественным облучением ККМ характеризуются полиорганностью и неспецифическими реакциями тканей (органов) на хроническое облучение. Отмеченные изменения со стороны иммунитета, органов чувств, нервной, кроветворной, эндокринной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и мочеполовой систем человека свидетельствуют о вовлечении всего организма в патологический процесс уже на ранней стадии ХЛС.

Опыт медицинского наблюдения за лицами с ХЛС легкой степени тяжести свидетельствует о том, что прекращение хронического облучения или значительное снижение мощности дозы приводит к постепенному, но полному восстановлению функции органов, вовлеченных в патологический процесс. Это делает диагностику ХЛС на начальной стадии чрезвычайно важной медицинской и радиобиологической проблемой. Однако по результатам многолетнего медицинского наблюдения за жителями прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, показано, что диагностика ХЛС на начальной стадии представляет очевидные сложности. Основными объективными причинами диагностических ошибок являлись: неспецифичность клинических проявлений и отсутствие патогномичных симптомов заболевания, отсутствие информации по индивидуальным дозам облучения и недостаток информации о состоянии здоровья людей до начала облучения. Вследствие этих причин верификация случаев ХЛС проводилась несколько раз [6, 7, 10, 20, 21]. Важным субъективным фактором, затрудняющим диагностику, являлся недостаток знаний о патогенезе и характере ранних проявлений ХЛС [6, 7].

Умеренная выраженность реакций тканей и их транзиторный характер, а также отсутствие органических изменений в тканях внутренних органов при обследовании пациентов с ХЛС на ранней стадии свидетельствовали об их функциональной природе. Транзиторные функциональные изменения в начальном периоде формирования ХЛС регистрировались также со стороны гемопоэза и регуляторных систем (нервной, эндокринной и иммунной). Функциональные изменения регуляторных систем в клинической картине на ранней стадии ХЛС часто преобладали. Характер реакций тканей (органов) на ранней стадии ХЛС может свидетельствовать о первичности нарушений регуляторных систем в патогенезе ХЛС. В этой связи можно полагать, что в основе ранних висцеральных проявлений ХЛС лежат индуцированные хроническим действием ИР нарушения регуляторных систем, которые позволяют

определить начальную стадию ХЛС как стереотипную дизрегуляторную патологию. Реакции же висцеральных органов в периоде формирования ХЛС являются вторичными и опосредованы сосудистыми, обменными и эндокринными нарушениями [6, 7, 24]. Важным доказательством вторичности висцеральных нарушений на ранней стадии ХЛС является высокая их частота при вегетативной дисфункции [16, 17].

Проведенный анализ позволил также идентифицировать самые ранние симптомы, которые нередко регистрировались до формирования типичных гематологических изменений, присущих ХЛС. Такими ранними клиническими признаками ХЛС являлись нарушения функции органов чувств и системного иммунитета.

Объективные изменения гемопоэза в виде цитопений, которые имеют наибольшее значение для анализа зависимости доза–эффект, на начальных стадиях также носили функциональный характер (например, задержка созревания костномозговых гранулоцитов на стадии миелоцита вызывала нейтропению и левый сдвиг лейкоцитарной формулы крови). Кроме того, в ранние сроки отмечалось повышение числа миелокариоцитов с нарушениями митоза (преимущественно клампинг хромосом) и летальными абберациями (преимущественно с фрагментозом ядра и кариомерами). Если уровень аномалий в эритроидном ростке был достаточно хорошо компенсирован повышением пролиферативной активности эритрокариоцитов, то повышение частоты митозов в костномозговых гранулоцитах не было столь эффективным вследствие высокой частоты аномальных (преимущественно «сцепленных») митозов.

Опыт диагностики ХЛС свидетельствовал, что информация о дозе облучения и пространственно-временном ее распределении в организме облученного человека также имеет первостепенное значение. Во-первых, она позволяет сконцентрировать внимание на случаях с превышением порога дозы для развития ХЛС, а, во-вторых, провести анализ зависимости выявленных симптомов от мощности дозы. Расчетная оценка порога дозы для развития ХЛС, вызванного общим внешним γ -облучением персонала ПО «Маяк», составляет 0,7 Гр [25].

Как отмечалось, клиническая картина ХЛС у жителей прибрежных сел реки Течи в период формирования синдрома не имела патогномоничных симптомов. Однако последовательность их развития и регрессии являются уникальными и зависят от мощности дозы облучения критических органов (иммунотомоза и нервной системы). Мощность дозы, как правило, определяет выраженность реакций тканей различных органов, вовлеченных в патологический процесс, а наличие зависимости между ними является хорошим диагностическим критерием подтверждения радиационной природы установленных изменений. Наиболее четкая зависимость от дозиметрических параметров была отмечена для ранних гематологических изменений [12, 15, 19]. Анализ клеточного состава периферической крови в динамике показал, что мощность дозы облучения ККМ уже на ранней стадии заболевания является определяющим фактором развития цитопений. Аналогичная, но ме-

нее отчетливая зависимость от мощности дозы установлена и для изменений системного иммунитета [26].

Наибольший диагностический интерес представляет анализ зависимости реакции гемопоэза в динамике от изменений мощности дозы. Так, у жителей прибрежных сел реки Течи после снижения мощности дозы облучения ККМ на ранней стадии ХЛС до 100 мГр/год и ниже наблюдалось спонтанное восстановление кроветворения, которое постепенно приводило к нормализации клеточного состава периферической крови до исходного уровня [27]. В случае продолжения облучения в ККМ развивались органические изменения (дистрофия, фиброз, гипоплазия ККМ и сосудистые изменения), которые исключали полное восстановление кроветворения [6, 7]. В условиях прекращения облучения или значительного снижения мощности дозы облучения ККМ на фоне улучшения гемопоэза отмечалось восстановление функций и нервной системы, тогда как в условиях продолжающегося облучения вегетативная дисфункция, астения, нарушения гемопоэза, иммунитета и внутренних органов прогрессировали. Частота, характер и степень выраженности висцеральных нарушений таким же образом зависели от величины мощности и суммарной органной дозы, но эта зависимость была менее выражена.

Поскольку начальные симптомы ХЛС не являются специфическими и могут иметь место у человека при других заболеваниях, а также при воздействии нерадиационных факторов химической и физической природы, дифференциальный диагноз является обязательной процедурой. При дифференциации с соматическими заболеваниями, в первую очередь, следует обратить внимание на заболевания крови (лейкозы, апластические и гипопластические состояния), инфекционные и паразитарные заболевания (бруцеллез, туберкулез, малярия, гельминтозы), астенические состояния вследствие травм центральной нервной системы, эндокринные расстройства, злокачественные опухоли. Особенное значение для дифференциальной диагностики синдрома имеет гематологическая симптоматика; важно исключить иное происхождение цитопении. Так как ранние проявления синдрома имеют функциональный характер, необходимо принимать во внимание и индивидуальные физиологические отклонения от нормы, которые способны также существенно затруднить диагностику ХЛС.

Таким образом, вследствие сложности диагностики ХЛС на ранней стадии процедура должна включать два этапа. Подозрение на ХЛС может возникать в случае наличия у человека, подвергающегося хроническому радиационному воздействию в диапазоне доз выше пороговых значений (дозы на ККМ более 0,7 Гр), комплекса вышеописанных симптомов. Верификация диагноза базируется на анализе зависимости доза–эффект. Как было показано, степень выраженности ранних реакций органов (тканей) при ХЛС определяется мощностью дозы и поглощенной органной дозой. Однако складывается впечатление, что с увеличением мощности величина дозы облучения ККМ, достаточная для развития ранних изменений гемопоэза, снижается. Наиболее выраженная зависимость от дозы облучения ККМ отмечалась для показателей

гемопоза, что было, по-видимому, обусловлено наиболее высокими дозами облучения ККМ у жителей прибрежных сел реки Течи и биологической значимостью иммуногемопоза в развитии ХЛС.

Последующая верификация диагноза ХЛС должна проводиться на основе динамического медицинского наблюдения за состоянием критических систем (иммуногемопоза, нервной и эндокринной). Ключевое значение для ранней диагностики ХЛС имеет анализ динамики развития основных симптомов, характерных для ранней стадии, в зависимости от мощности органной дозы. Особенное значение для диагностики имеет анализ динамики состояния гемопоза, для которого отмечается хорошая зависимость от мощности дозы облучения (например, зависимость изменения числа нейтрофилов и тромбоцитов в периферической

крови от мощности дозы облучения ККМ). Важно отметить, что наблюдается некоторая задержка во времени (несколько месяцев) реакции кроветворения после изменения мощности дозы облучения ККМ [28]. При диагностике ХЛС необходимо также учитывать продолжительность латентного периода, индивидуальную радиочувствительность, исходное состояние здоровья и влияние сопутствующих факторов нерадиационной природы. На практике из-за отсутствия дозиметрической информации невозможно однозначно трактовать выявленные изменения как проявления ХЛС. В случае отсутствия прямых дозиметрических измерений необходимо использовать методы ретроспективной биологической дозиметрии (цитогенетические исследования, ЭПР-дозиметрия и др.).

Medical Radiology and Radiation Safety. 2020. Vol. 65. No. 5. P. 21–28

Radiation Medicine

Diagnosis of Chronic Radiation Syndrome at the Early Stage

A.V. Akleyev^{1,2}

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

E-mail: akleyev@urcrm.ru

ABSTRACT

Purpose: To describe early symptoms of chronic radiation syndrome (CRS) which is of utmost importance for diagnosing this rare radiation pathology in man.

Material and methods: The paper presents the findings of retrospective analysis of early clinical manifestations of chronic radiation syndrome (CRS) based on the data of a long-term medical follow up of the residents of the Techa riverside communities. Mean doses of postnatal exposure to red bone marrow in patients with CRS calculated with TRDS-2016D were 698.8 ± 18.2 mGy, maximum doses were 3 603.9 mGy.

Results: Clinical picture of the CRS at the early stage was characterized by a set of non-specific changes including hematological, immune, neurological, and endocrine ones, as well as impairment of functions of a number of internal organs. The above-mentioned CRS symptoms developed in a certain sequence and depended on dose rate and absorbed dose to the organs. Prior to the development of a full-scale CRS clinical picture patients had a decrease in olfactory and taste thresholds, in vibration sensitivity, and changes in systemic immunity. Impairment of hematopoiesis, nervous and endocrine systems were also noted even at the early stage of CRS. Initial CRS changes were moderate and transient. The analysis of early CRS symptoms allows assuming that early CRS stage is a dysregulation pathology that is caused initially by radiation-induced disorders of immunohematopoiesis, nervous and endocrine systems. Visceral changes at the early CRS stage are secondary and functional. If exposure is terminated, they are reversible. However, if exposure continues at doses high enough to cause morphological changes in organs and tissues (dystrophy, fibrosis, hypoplasia, etc.), CRS course worsens and becomes irreversible.

Conclusion: It was demonstrated that CRS diagnosis at the early stage is very complicated. The key issue is to analyze the relationship of specific CRS symptoms development and dose rate and absorbed organ doses.

Key words: chronic radiation syndrome, diagnosis, symptoms, dose, dose rate

For citation: Akleyev AV. Diagnosis of Chronic Radiation Syndrome at the Early Stage. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):21-8 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-21-28

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гуськова АК. Хроническая лучевая болезнь от равномерно-го облучения. В кн.: «Радиационные поражения человека». М.: Слово. 2007. С. 85–102. [Guskova AK. Chronic radiation sickness due to uniform exposure. In: Radiation Injuries in Man. Moscow: Slovo. 2007: 85–102. (In Russ.).]
2. Куршаков НА. Хроническая лучевая болезнь. Бюлл. радиац. медицины. 1956;(4):3–20. [Kurshakov NA. Chronic radiation sickness. Bulletin Radiat Med. 1956;(4):3–20. (In Russ.).]
3. Глазунов ИС, Благовещенская ВВ, Малахова ВВ. Основные итоги научных исследований по радиационной неврологии. Бюлл. радиац. медицины. 1959;(1a):3–15. [Glazunov IS, Blagoveschenskaya VV, Malakhova VV. Major findings of scientific studies on radiation neurology. Bulletin Radiat Med. 1959;(1a):3–15. (In Russ.).]
4. Байсоголов ГД, Спрингш ВН. Функциональное состояние кроветворения в периоде последствий хронической лучевой болезни. Бюлл. радиац. медицины. 1960;(1a):96–8. [Baysogolov GD, Springish VN. Functional state of hematopoiesis in the period of chronic radiation sickness consequences. Bulletin Radiat Med. 1960;(1a):96–8. (In Russ.).]
5. Киреев ПМ. Особенности клинического течения хронической лучевой болезни в зависимости от характера радиационного воздействия. Бюлл. радиац. медицины. 1962;(2a):6–10. [Kireyev PM. Characteristics of the clinical course of chronic radiation sickness depending on the nature of radiation exposure. Bulletin Radiat Med. 1962;(2a):6–10. (In Russ.).]
6. Аклеев АВ. Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча. Челябинск: Книга. 2012. 464 с.

- [Akleyev AV. Chronic Radiation Syndrome in Residents of the Techa Riverside Villages. Chelyabinsk: Kniga; 2012. (In Russ.)].
7. Akleyev AV. Chronic radiation syndrome. Berlin Heidelberg: Springer; 2014. 410 p.
 8. Глаголенко ЮВ, Дрожко ЕГ, Мокров ЮГ и др. Восстановление параметров источника сбросов жидких радиоактивных отходов радиохимического производства в р. Теча. Сообщение 1. Разработка методики и основные результаты. Вопросы радиационной безопасности. 2008;(S):76-91. [Glagolenko YuG, Drozhko EG, Mokrov YuG, et al. Reconstruction of parameters of the source of liquid radioactive waste discharges from the radiochemical production into the Techa River. Report 1: Development of methods, main results. Journal of Radiation Safety. 2008;(S):76-91. (In Russ.)].
 9. Марей АН. К вопросу о предельных уровнях содержания стронция-90 в организме человека. Бюлл. радиац. медицины. 1961;(2a):25-39. [Marey AN. On the issue of critical levels of strontium-90 in a human body. Bulletin Radiat Med. 1961;(2a):25-39. (In Russ.)].
 10. Kossenko MM, Akleyev AV, Degteva MO, Kozheurov VH, Degtyarova RG. Analysis of chronic radiation sickness cases in the population in the Southern Urals. AFRRI report: Bethesda, Maryland; 1994.
 11. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Shagina NB, Volchkova AYU, et al. Enhancements in the Techa river dosimetry system: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures. Health Phys. 2019 Oct; 117(4):378-87.
 12. Алексеева ОГ, Вялова НА, Гребенева АА и др. Клиника хронической лучевой болезни, вызванной продуктами деления урана. Бюлл. радиац. медицины. 1962;(1a):108-12. [Alekseyeva OG, Vyalova NA, Grebeneva AA, Ivanov VA, Kireyev PM, Shamordina AF. Clinical picture of the chronic radiation sickness induced by uranium fission products. Bulletin Radiat Med. 1962;(1a):108-12. (In Russ.)].
 13. Муксинова КН. Клеточные и молекулярные основы перестройки кроветворения при длительном радиационном воздействии. М.: Энергоатомиздат. 1990. 161 с. [Muksinova KN, Mushkachyova GS. Cellular and Molecular Basis for Rearrangement of Hemopoiesis in Long-term Radiation Exposures. Energoatomizdat; 1990. (In Russ.)].
 14. Иванов ВА, Северин СФ, Ярцев ЕИ и др. Состояние здоровья людей в ближайшие годы после прекращения контакта с продуктами деления урана. Бюлл. радиац. медицины. 1963;(3a):78-85. [Ivanov VA, Severin SF, Yartsev EI, Nikiforova VA, Perpechko AS, Tsaplina KI. Health status of people in the years immediately after the termination of the contact with uranium fission products. Bulletin Radiat Med. 1963;(3a):78-85. (In Russ.)].
 15. Алексеева ОГ, Вялова НА, Гребенева АА и др. Динамическое наблюдение за состоянием здоровья людей, подвергшихся воздействию продуктов деления урана. Бюлл. радиац. медицины. 1963;(1a):47-52. [Alekseyeva OG, Vyalova NA, Grebeneva AA, et al. Dynamic follow up of the health status of people exposed to uranium fission products. Bulletin Radiat Med. 1963;(1a):47-52. (In Russ.)].
 16. Иванов ВА. Результаты медицинского наблюдения за людьми, подвергшимися воздействию продуктов деления урана. Бюлл. радиац. медицины. 1971;(2):12-20. [Ivanov VA. Results of the medical follow up of people exposed to uranium fission products. Bulletin Radiat Med. 1971;(2):12-20. (In Russ.)].
 17. Иванов ВА. Результаты медицинского наблюдения за людьми, проживавшими в районах, загрязненных продуктами деления. М.: Дисс. докт. мед. наук. 1968. 544 с. [Ivanov VA. Results of medical follow up of the people residing in the areas contaminated with the uranium fission products. Dissertation. Moscow; 1968. (In Russ.)].
 18. Аклеев АВ, Косенко ММ. Обобщение результатов многолетнего изучения иммунитета у облученного населения Южного Урала. Иммунология. 1991;6:4-7. [Akleyev AV, Kossenko MM. Summary of the results of long-term immunity studies for the exposed population. Immunology. 1991;6:4-7. (In Russ.)].
 19. Вялова НА. К вопросу об изменениях крови у людей, имеющих контакт с полонием-210. Бюлл. радиац. медицины. 1959;(3a):59-63. [Vyalova NA. On changes of the blood in people who are in contact with polonium-210. Bulletin Radiat Med. 1959;(3a):59-63. (In Russ.)].
 20. Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Под ред. А.В. Аклеева, М.Ф. Киселева. М.: Медбиоэкстрем. 2001. 531 с. [Akleyev AV, Kisselyov MF, eds. Medical-Biological and Ecological Impacts of Radioactive Contamination of the Techa River. Ministry of Health of the Russian Federation; Moscow; 2001. (In Russ.)].
 21. Аклеев АВ, Аклеев АА, Андреев СС и др. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга. 2016. 390 с. [Akleyev AV (ed.), Akleyev AA, Andreyev SS, et al. Consequences of radioactive contamination of the Techa River. Chelyabinsk: Kniga; 2016. (In Russ.)].
 22. Вербенко АА, Чусова ВН. Об изменениях в половой сфере женщин при хронической лучевой болезни. Бюлл. радиац. медицины. 1967;(3):67-74. [Verbenko AA, Chusova VN. On changes in the genital sphere of women with chronic radiation sickness. Bulletin Radiat Med. 1967;(3):67-74. (In Russ.)].
 23. Остроумова ЕВ. Особенности клинического течения и исходов хронической лучевой болезни у лиц, подвергшихся длительному радиационному воздействию в антен- и постнатальном периодах. Тюмень: Дисс. канд. мед. наук. 2004. 154 с. [Ostroumova EV. Characteristics of the clinical course and outcome of chronic radiation sickness in people affected by long-term radiation exposure in prenatal and postnatal periods. Dissertation. Tyumen: Tyumen State Medical Academy; 2004. (In Russ.)].
 24. Akleyev AV. Normal tissue reactions to chronic radiation exposure in man. Radiat Protect Dosimetry. 2016 Sep; 171(1):107-16.
 25. Осовец СВ, Азизова ТВ, Банникова МВ. Оценка влияния дозовых характеристик на период формирования и длительность хронической лучевой болезни. Мед радиол и радиац безопасность. 2011;56(4):17-23. [Osovets SV, Azizova TV, Bannikova MV. Assessment of the impact of dose characteristics on the period of formation and duration of chronic radiation syndrome. Medical Radiology and Radiation Safety. 2011;56(4):17-23. (In Russ.)].
 26. Akleyev AV, Kossenko MM, Silkina LA, Degteva MO, Yachmenyov VA, Awa A, et al. Health effects of radiation incidents in the Southern Urals. Stem Cells. 1995 May; 13(1):58-68.
 27. Аклеев АВ. Хронический лучевой синдром у населения бассейна реки Теча. Радиационная биология. Радиоэкология. 2015;55(5):453-66. [Akleyev AV. Chronic radiation syndrome among the population of the Techa River basin. Radiation Biology. Radioecology. 2015;55(5):453-66. (In Russ.)].
 28. Аклеев АВ, Акушевич ИВ, Димов ГП и др. Реакции кроветворной системы на хроническое облучение у жителей прибрежных сел реки Течи. Мед радиол и радиац безопасность. 2011;56(5):10-20. [Akleyev AV, Akushevich IV, Dimov GP, Veremeyeva GA, Varfolomeyeva TA, Ukraintseva SV, et al. Hemopoietic system reactions of residents chronically exposed to ionizing radiation in the Techa River catchment area. Medical Radiology and Radiation Safety. 2011;56(5):10-20. (In Russ.)].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 14.09.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 14.09.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the author:

Akleyev A.V. <https://orcid.org/0000-0003-2583-5808>.

О.С. Цымбал¹, Д.С. Исубакова¹, Е.В. Брониовская¹, И.В. Мильто^{1,3},
М.В. Халюзова¹, Н.В. Литвяков^{1,2}, Р.М. Тахауов^{1,3}

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ВАК1 В ИНДУКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НИЗКОИНТЕНСИВНОМ ВНЕШНЕМ ОБЛУЧЕНИИ

¹ Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства, Северск

² Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск

Контактное лицо: Цымбал Ольга Сергеевна, mail@sbrsc.seversk.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучить связь статуса метилирования промотора *Bak1* с частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при хроническом внешнем облучении с низкой мощностью дозы.

Материал и методы: Исследование выполнено на группе, состоящей из 41 человека (31 мужчина и 10 женщин, возраст от 36 до 83 лет), которые являются действующими или бывшими работниками Сибирского химического комбината, подвергавшимися и не подвергавшимися хроническому внешнему облучению с низкой мощностью дозы в ходе профессиональной деятельности. Работники, включенные в исследование, были распределены на две группы: первая — 15 человек вне профессионального облучения, вторая — 26 человек, имеющие облучение (γ -излучение, суммарная доза 89–716 мЗв). Для выделения ДНК и оценки хромосомных aberrаций в лимфоцитах использовалась цельная кровь. Статус метилирования промотора *Bak1* устанавливался с помощью метилчувствительной ПЦР, которая проводилась после предварительной обработки выделенной ДНК метилчувствительной рестриктазой AoxI. Полученные количественные данные анализировались с использованием статистического пакета Statistica 10. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты: Статус метилирования промотора *Bak1* в исследуемых группах не различается ($p = 0,18$). Изучение влияния дозы внешнего облучения на статус метилирования промотора *Bak1* показало, что неметилированный промотор преобладает у работников со средней дозой облучения $273,4 \pm 43,8$ мЗв, тогда как метилированный промотор — у работников со средней дозой облучения $183,6 \pm 20,6$ мЗв ($p = 0,03$). Неметилированный промотор *Bak1* связан с повышенной частотой хроматидных фрагментов в лимфоцитах крови работников второй группы ($p = 0,03$).

Заключение: Статус метилирования промотора *Bak1* в лимфоцитах крови человека при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении не изменяется, однако наблюдается его зависимость от дозы облучения и связь с повышенной частотой хромосомных aberrаций (хроматидных фрагментов). Так, неметилированный промотор *Bak1* преобладает при повышении дозы внешнего облучения. Увеличение частоты хроматидных фрагментов ассоциировано с неметилированным промотором *Bak1*. Кроме того, воздействие хронического облучения с низкой мощностью дозы сопровождается снижением частоты хромосомных фрагментов в лимфоцитах крови работников СХК.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, метилирование промоторов, апоптоз, хроническое внешнее облучение, низкая мощность дозы

Для цитирования: Цымбал О.С., Исубакова Д.С., Брониовская Е.В., Мильто И.В., Халюзова М.В., Литвяков Н.В., Тахауов Р.М. Роль метилирования *Bak1* в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):29–34.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-29-34

Введение

Ионизирующее излучение (ИИ) является основным неблагоприятным техногенным фактором, действующим на организм работников предприятий атомной отрасли. На современном этапе развития атомной отрасли России профессиональное облучение в большинстве случаев является низкоинтенсивным, то есть ИИ воздействует в малых (до 0,1 Зв) и средних (до 1 Зв) дозах, с низкой мощностью дозы.

ИИ вызывает изменение на организменном, органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях. Следует отметить, что эффекты низкоинтенсивного ИИ наиболее выражены на клеточном и субклеточном уровнях. Признанной радиобиологической моделью установления влияния ИИ на клеточном уровне являются лимфоциты крови. В ответ на воздействие ИИ в клетках запускается ряд защитных процессов: репарация ДНК, остановка клеточного цикла, апоптоз и др. [1]. Нарушение процесса репарации ДНК приводит к возникновению различных хромосомных aberrаций, которые являются признанными маркерами радиационного повреждения генома.

Основными структурными изменениями в облученных клетках являются ацентрические хроматид-

ные и хромосомные фрагменты, а также дицентрические и кольцевые хромосомы. В случае невозможности репарации ДНК в клетке инициируется запрограммированная клеточная гибель, которая наиболее часто реализуется по механизму апоптоза. Активация апоптоза, вызванная воздействием ИИ, защищает многоклеточный организм от образования и пролиферации радиационно-индуцированных мутантных клеток [2]. Известно, что с увеличением дозы ИИ увеличивается количество повреждений ДНК и повышается активность апоптоза. Однократное воздействие на культуры лимфоцитов крови высокоинтенсивным γ -излучением (диапазон доз 1–6 Гр) индуцирует апоптоз в этих клетках сильнее, чем низкоинтенсивное γ -излучение в том же дозовом диапазоне [3]. Однако при низкоинтенсивном хроническом облучении в дозе более 96 мЗв активность апоптоза снижается, вследствие чего накапливаются цитогенетические аномалии в лимфоцитах крови человека [4].

Активация или репрессия апоптоза регулируется белками-индукторами и ингибиторами, а также их соотношением. Ключевую роль в регуляции митохондриального пути апоптоза играют белки семейства Bcl-2, которые активируются в ответ на повреждение

ДНК. Семейство Bcl-2 включает проапоптотические и антиапоптотические белки. Проапоптотическими белками семейства Bcl-2 являются: Bak, Bax, Bik, Bad, Bid, Bcl-Xs. Белок, кодируемый геном *Bak* (бр21.31), участвует в активации апоптоза путем взаимодействия с наружной поверхностью мембраны митохондрий в местах контакта наружной и внутренней мембран митохондрий — физиологические поры (мегаканалы). Взаимодействие Bak с белками физиологических пор приводит к расширению последних и выходу в цитозоль цитохрома c, который в обычных условиях не проходит через физиологические поры. Цитохром C взаимодействует с цитоплазматическими белками APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) и прокаспазой 9, формируя апоптосому, которая активирует каспазы 3 и 7. Последние, в свою очередь, иницируют протеолиз и освобождают связанную ДНКазу, разрушающую хроматин [2]. Bak (30 кДа) поддерживает высокую концентрацию Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, необходимую для реализации Ca^{2+} -зависимой гибели клеток [5]. Этот белок взаимодействует с опухолевым супрессором p53 после того, как клетка была подвержена воздействию повреждающего фактора. В исследовании Struijk L. et al. показано, что специфические бета-папилломавирусы в первичных кератиноцитах человека снижают активность апоптоза при воздействии УФ-излучения [6]. В опухолевых клетках (глиобластомы человека) обнаружена взаимосвязь двух проапоптотических белков — Bak и Bax: дефицит Bax компенсируется увеличением экспрессии Bak, а при двойном дефиците Bax и Bak снижается активность апоптоза [7]. Воздействие ИИ приводит к олигомеризации Bak и Bax, снижению мембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий и высвобождению цитохрома c в цитозоль [8].

Ионизирующее излучение также оказывает влияние на процесс метилирования ДНК в клетках. Так, изменение статуса метилирования ДНК (гипо- и гиперметилирование) существенным образом отражается на таких процессах как регуляция экспрессии генов, клеточная дифференцировка, репликация ДНК, процессы репарации и поддержания геномной стабильности [9]. Оценка статуса метилирования ДНК в CpG-динуклеотидах [10, 11] и CpG-островках [12] используется для диагностики некоторых онкологических заболеваний. Воздействие ИИ индуцирует aberrантное метилирование CpG-островков промоторов генов клеточного цикла и детоксикации, участвующих в основных защитных функциях клетки [13]. Информация о влиянии ИИ на статус метилирования промотора *Bak1* в лимфоцитах крови человека в современной научной литературе отсутствует.

В связи с этим целью настоящего исследования является изучение связи статуса метилирования промотора *Bak1* с частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении.

Материал и методы

В исследование включены бывшие или действующие работники СХК, всего в исследовании приняли участие 41 человек — 31 мужчина и 10 женщин (возраст от 36 до 83 лет), проработавшие на основном

производстве не менее 10 лет. От каждого работника СХК было получено добровольное информированное согласие. Работники СХК были распределены на две группы: первая — 15 человек, не имеющие облучения, и вторая — 26 человек, имеющие внешнее облучение (γ -излучение, суммарная доза 89–716 мЗв, медиана 184 мЗв, межквартильный интервал 162–254 мЗв). Критерием включения в исследование являлось наличие внешнего облучения в дозе от 50 мЗв до 1 Зв. Критерием исключения из исследования являлось наличие внутреннего и сочетанного облучения, а также злокачественных новообразований и инфаркта миокарда.

Забор крови для исследования у представителей обеих групп осуществлялся в пробирки типа Vacuette (Greiner Bio-One GmbH, Австрия): для выделения ДНК кровь забирали в пробирки с ЭДТА; для приготовления цитогенетических суспензий — в пробирки с Li-гепарином.

Выделение ДНК осуществлялось из цельной крови набором QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя (<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>). Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Выделенная ДНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Япония).

Цитогенетические суспензии готовились в стерильных условиях ламинарного шкафа (Kojaig, Финляндия). Цельная кровь смешивалась с питательной средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей L-глутамин (ПанЭко, Россия), эмбриональную телячью сыворотку (ПанЭко, Россия) и фитогемагглютинин (Sigma, США), после чего инкубировалась в культуральных флаконах при 37°C в орбитальном шейкере-инкубаторе (Biosan Sia, Латвия) в течение 48 ч. За 1,5 ч до завершения инкубации в культуральную среду добавлялся колхицин (ПанЭко, Россия). Разрушение клеток проводилось путем гипотонизации клеточной суспензии с использованием 0,56 %-го раствора KCl. Полученная суспензия фиксировалась смесью этанола и ледяной уксусной кислоты, в соотношении 3:1. Затем суспензия наносилась на предметные стекла и окрашивалась красителем Гимза (ПанЭко, Россия). Микроскопирование цитогенетических препаратов проводилось на микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия) при увеличении 1000. У каждого работника оценивали не менее 300 метафазных пластинок на наличие хромосомных aberrаций. Учитывалось общее число aberrантных клеток, а также ацентрические одиночные фрагменты (далее — хроматидные фрагменты) и ацентрические парные фрагменты (далее — хромосомные фрагменты), хроматидные обмены, ацентрические и центрические кольцевые хромосомы (далее — кольцевые хромосомы), дицентрические хромосомы, полиплоидные и мультиабerrантные (имеющие более 5 aberrаций) клетки. Дополнительно рассчитывались хромосомные aberrации как сумма хромосомных фрагментов, кольцевых и дицентрических хромосом. Результаты цитогенетического исследования выражались в виде частоты aberrантных

Таблица 1

**Праймеры промотора *Bak1*
для метилчувствительной ПЦР**
Bak1 promoter primers for methyl-sensitive PCR

Праймер	Последовательность	Ампликон	t отжига
Sense	5'-tga-gaa-tca-ggg-atg-gga-aa-3'	271 н.п.	59,7 °C
Antisense	5'-ctg-gat-gta-gcc-ttt-act-tgt-cc-3'		

клеток или различных видов хромосомных aberrаций на 100 проанализированных метафазных пластинок.

Метилчувствительная ПЦР использовалась для определения статуса метилирования промотора *Bak1*. Выделенная ДНК лейкоцитов крови подвергалась гидролизу при помощи метилчувствительной эндонуклеазы рестрикции AoxI (СибЭнзим, Россия). Фермент AoxI расщепляет только C5-метилированную ДНК и не гидролизует немодифицированную ДНК. Сайт рестрикции для AoxI — 5'-[^]PuG(5mC)Py-3'/3'-Py(5mC)GPy[^]-5'. Фермент AoxI гидролизует ДНК в местах, указанных символом «[^]». Метилчувствительная ПЦР проводилась с ДНК, предварительно обработанной эндонуклеазой рестрикции AoxI, и праймерами к промотору *Bak1*. Праймеры были комплементарны сайту узнавания эндонуклеазы рестрикции, поэтому исследуемый фрагмент амплифицировался только при отсутствии расщепления ДНК ферментом AoxI. Праймеры подобраны с использованием программы Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США), последовательность которых представлена в табл. 1. Нуклеотидная последовательность промотора исследованного гена была найдена в базе данных Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchPromForm>).

Визуализация продуктов ПЦР проводилась в 2,5 %-м агарозном геле с напряжением 30 В в течение 4 ч. Электрофореграмма получена с использованием Molecular Imager®Gel Doc™ XR System (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica 10 (StatSoft, США). Для установления различий между статусом метилирования промотора *Bak1* в обеих группах использовали F-критерий Фишера. Для определения связи статуса метилирования промотора *Bak1* с частотой хромосомных aberrаций использовали U-критерий Манна — Уитни. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала Me (Q₂₅; Q₇₅). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На основании результатов электрофореза продуктов метилчувствительной ПЦР каждой пробе, вне зависимости от группы исследования, был присвоен статус «метилированный промотор *Bak1*» и «неметилированный промотор *Bak1*». Неметилированный промотор включал в себя полностью неметилированный и частично метилированный промоторы.

Исследование статуса метилирования промотора *Bak1* (рис. 1) выявило преобладание метилированного (61 %) над неметилированным (39 %) промотором в обе-

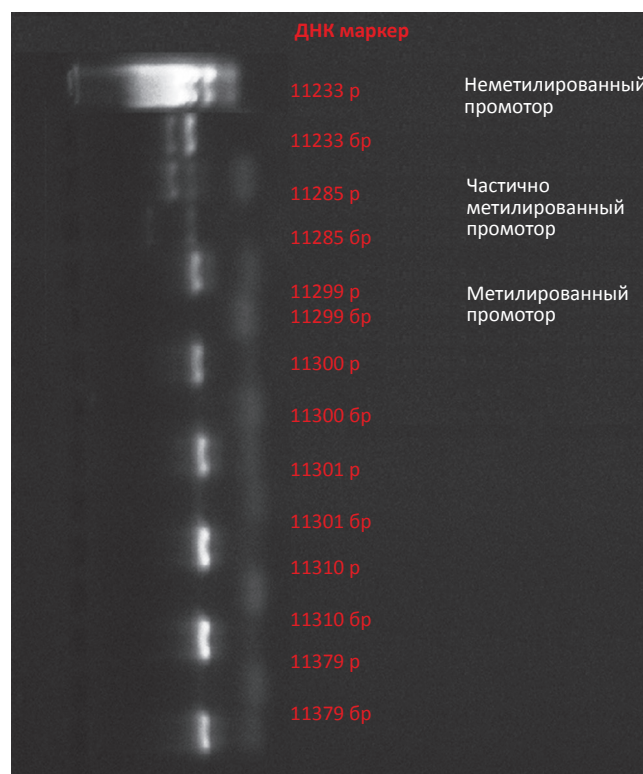


Рис. 1. Электрофореграмма метилчувствительной ПЦР промотора *Bak1*.

p — образец с добавлением фермента рестрикции, bp — образец без добавления фермента рестрикции

Fig. 1. Electrophoregram of methyl-sensitive PCR of the *Bak1* promoter. p — sample with restriction enzyme addition, bp — sample without restriction enzyme addition

их группах. Однако статистически значимых различий в статусе метилирования промотора *Bak1* между обеими изучаемыми группами работников СХК не выявлено (табл. 2).

Изучение влияния дозы внешнего облучения на статус метилирования промотора *Bak1* выявило (табл. 3) преобладание у работников неметилированного промотора при большей суммарной дозе облучения ($p = 0,03$). Следовательно, более высокие дозы внешнего облучения могут приводить к частичному или полному деметилированию промотора *Bak1*.

Изучение связи статуса метилирования промотора *Bak1* и частоты хромосомных aberrаций показало, что из всех изученных цитогенетических аномалий в обеих группах хроматидные фрагменты с большей частотой ($p = 0,03$) встречаются в случае неметилированного промотора *Bak1* (табл. 4). Мультиабберрантные и полиплоидные клетки исключены из дальнейшего анализа, поскольку не были обнаружены ни в одной из изучаемых групп.

Деметилирование промотора *Bak1* под действием ИИ должно сопровождаться повышением экспрессии этого гена и, как следствие, активацией апоптоза, который способствует элиминации поврежденных клеток и сохранению клеточного гомеостаза в многоклеточном организме [9, 11]. Однако оценка радиочувствительности мононуклеарных клеток крови человека показала, что их однократное низкоинтен-

Таблица 2

Статус метилирования промотора *Bak1* в исследованных группах**Methylation status of the *Bak1* promoter in the studied groups**

Группа исследования	Кол-во работников с метилированным промотором, чел.	Кол-во работников с неметилированным промотором, чел.	Уровень значимости <i>p</i>
Первая	11	4	0,18
Вторая	14	12	
Всего	25	16	

Примечание: *p* — уровень статистической значимости по *F*-критерию Фишера

сивное внешнее облучение в малых дозах приводит к снижению экспрессии проапоптотического гена *BAX*. Уровень экспрессии *BAX* в лимфоцитах крови изменяется в зависимости от дозы и времени после облучения. Экспрессия *BAX* восстанавливается до нормального уровня спустя 168 ч после облучения [14]. Вероятно, хроническое низкоинтенсивное внешнее облучение лимфоцитов крови в малых дозах, в отличие от однократного низкоинтенсивного внешнего облучения, сопровождается более выраженной и стойкой активацией генов апоптоза.

В данном исследовании в лимфоцитах крови работников СХК, имеющих неметилированный промотор *Bak1*, возрастает частота хроматидных фрагментов. С одной стороны, можно предположить, что с увеличением дозы внешнего облучения повышается частота хромосомных aberrаций, вследствие чего начинается деметилирование промотора *Bak1* и активация экспрессии *Bak1*. Однако изолированного увеличения экспрессии *Bak1*, по-видимому, недостаточно для индукции апоптоза в лимфоцитах. С другой стороны, деметилирование промотора *Bak1* может индуцировать образование хроматидных фрагментов. Известно, что в опухолевых клетках повышается степень метилирования промоторов различных генов. В частности, было показано увеличение степени метилирования промотора *Bak1* в опухолевых клетках

Таблица 3

Статус метилирования промотора *Bak1* во второй группе в зависимости от дозы облучения**The methylation status of the *Bak1* promoter in the second group depending on the radiation dose**

Статус метилирования	N	Доза внешнего облучения, мЗв, Ме (Q_{25} ; Q_{75})	Уровень значимости <i>p</i>
Метилированный промотор	14	170,5 (125,1; 187,4)	0,03
Неметилированный промотор	12	230,8 (194,2; 272,7)	

Примечание: Ме — медиана; (Q_{25} ; Q_{75}) — межквартильный интервал; *p* — уровень статистической значимости по *U*-критерию Манна — Уитни

яичка, которое сопровождается снижением интенсивности апоптоза, увеличивает нестабильность генома и скорость прогрессии опухоли. Кроме того, экспрессия *Bak1* репрессируется путем KITLG-KIT, вследствие того, что онкоген KIT часто мутирован в клетках опухолей различного генеза [15].

Сравнение частоты хромосомных aberrаций в исследуемых группах показало отличие только по частоте хромосомных фрагментов (табл. 5). В настоящем исследовании установлено увеличение частоты хромосомных фрагментов в лимфоцитах крови работников СХК первой группы. Необходимо отметить, что кольцевые и дицентрические хромосомы, а также ацентрические фрагменты (в т. ч. хромосомные) являются маркерами радиационного повреждения клетки. Кроме того, они могут выступать в качестве маркера повышенного риска развития радиогенных злокачественных новообразований на фоне низкоинтенсивного внешнего облучения [4]. Выявление хромосомных фрагментов у работников, не подвергавшихся облучению, может быть обусловлено воздействием на их организм вредных производственных химических факторов, неблагоприятными экологическими условиями и особенностями образа жизни (например, курение, употребление алкоголя и др.). Более низкая частота хромосомных фрагментов у работников СХК, подвергавшихся техногенному низкоинтенсивному

Таблица 4

Частота цитогенетических аномалий у работников СХК исследованных групп в зависимости от статуса метилирования промотора *Bak1***Frequency of cytogenetic disorders in workers of the SGCE of the studied groups depending on the methylation status of the *Bak1* promoter**

Цитогенетические аномалии	Метилированный промотор (<i>n</i> = 25), Ме (Q_{25} ; Q_{75})	Неметилированный промотор (<i>n</i> = 16), Ме (Q_{25} ; Q_{75})	Уровень значимости <i>p</i>
Аберрантные клетки	2,52 (1,33; 3,03)	2,51 (1,76; 3,53)	0,32
Хромосомные aberrации	1,26 (0,93; 2,12)	1,75 (0,97; 2,11)	0,47
Хроматидные фрагменты	0,33 (0,14; 0,93)	0,91 (0,51; 1,22)	0,03
Хромосомные фрагменты	0,33 (0,00; 0,95)	0,33 (0,10; 0,96)	0,95
Кольцевые хромосомы	0,00 (0,00; 0,29)	0,00 (0,00; 0,32)	0,59
Дицентрические хромосомы	0,67 (0,31; 0,99)	0,83 (0,33; 1,21)	0,51
Хроматидные обмены	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,75

Примечание: Ме — медиана; (Q_{25} ; Q_{75}) — межквартильный интервал; *p* — уровень статистической значимости; полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия

Таблица 5

Частота цитогенетических аномалий у работников СХК исследуемых групп
Frequency of cytogenetic disorders in workers of the SGCE of the studied groups

Цитогенетические аномалии	Первая группа (n = 15), Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Вторая группа (n = 26), Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Уровень значимости <i>p</i>
Аберрантные клетки	2,21 (1,33; 2,97)	2,58 (1,68; 3,41)	0,19
Хромосомные aberrации	1,00 (0,93; 2,17)	1,70 (1,00; 2,12)	0,24
Хроматидные фрагменты	0,92 (0,33; 1,00)	0,51 (0,00; 0,97)	0,19
Хромосомные фрагменты	0,63 (0,32; 1,24)	0,32 (0,00; 0,67)	0,05
Кольцевые хромосомы	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,32)	0,08
Дицентрические хромосомы	0,63 (0,31; 0,83)	0,91 (0,33; 1,25)	0,06
Хроматидные обмены	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,29)	0,48

Примечание: Me — медиана; (Q₂₅; Q₇₅) — межквартильный интервал; *p* — уровень статистической значимости; полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия

внешнему облучению, может быть связана с повышенной активностью защитных процессов в клетках (репарация повреждений ДНК, апоптоз, детоксикация ксенобиотиков и др.) вследствие адаптивного эффекта (радиационного гормезиса), при котором воздействие малых доз внешнего облучения сопровождается увеличением радиорезистентности клеток к последующим более высоким дозам внешнего облучения.

В проведенных нами ранее исследованиях [4] в лимфоцитах крови работников СХК с внешним облучением помимо увеличения частоты хромосомных фрагментов установлено также увеличение частоты таких цитогенетических показателей, как аберрантные клетки, хроматидные фрагменты, дицентрические хромосомы и полиплоидные клетки. Различия в спектре и частоте хромосомных aberrаций по результатам настоящего и предшествующего исследований можно объяснить меньшим объемом выборки в настоящей работе.

Заключение

Статус метилирования промотора *Bak1* в лимфоцитах крови человека при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении не изменяется (*p* = 0,18). Однако статус метилирования промотора *Bak1* связан с дозой внешнего облучения и с частотой хромосомных aberrаций. Так, неметилированный промотор *Bak1* преобладает при повышении дозы внешнего облучения (*p* = 0,03). Увеличение частоты хроматидных фрагментов ассоциировано также с неметилированным промотором *Bak1* (*p* = 0,03).

Воздействие хронического низкоинтенсивного внешнего облучения сопровождается снижением частоты хромосомных фрагментов в лимфоцитах крови работников СХК. Изучение влияния хронического низкоинтенсивного ИИ на статус метилирования промотора *Bak1* требует проведения дальнейших валидационных исследований на выборке большего объема для получения статистически достоверных результатов и расширения спектра цитогенетических показателей.

The Role of *Bak1* Methylation in the Induction of Chromosomal Aberrations under Chronic Low-Intensity External Radiation

**O.S. Tsymbal¹, D.S. Isubakova¹, E.V. Bronikovskaya¹, I.V. Milto^{1,3}, M.V. Khalyuzova¹, N.V. Litviakov^{1,2},
R.M. Takhauov^{1,3}**

¹ Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia

² Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

E-mail: mail@sbrc.seversk.ru

ABSTRACT

Purpose: To study the relationship between the methylation status of the *Bak1* promoter and the frequency of chromosomal aberrations in human blood lymphocytes under chronic low-intensity external ionizing radiation.

Material and methods: The study was performed on 41 people (31 men and 10 women, aged from 36 to 83 years) who are former or current employees of the Siberian Group of Chemical Enterprises, who have been exposed or haven't been exposed to chronic low-intensity external radiation in the course of their professional activities. The workers included in the study were divided into two groups: the first — 15 people who did not have exposure, the second — 26 people who had external exposure (gamma radiation, total dose 89–716 mSv). Whole blood was used to isolate DNA and evaluate chromosomal aberrations in lymphocytes. The methylation status of the *Bak1* promoter was determined using methylsensitive PCR, which was performed after pretreatment of the isolated DNA with methylsensitive AoxI restrictase. The obtained quantitative data were analyzed using the Statistica 10. The differences were considered statistically significant at *p* ≤ 0.05.

Results: The methylation status of the *Bak1* promoter in the study groups does not differ (*p* = 0.18). The study of the effect of external radiation dose on the methylation status of the *Bak1* promoter showed that the unmethylated promoter prevails in workers with an average radiation dose of 273.4 ± 43.8 mSv, while the methylated promoter — in workers with an average radiation dose

of 183.6 ± 20.6 mSv ($p = 0.03$). The unmethylated promoter *Bak1* is associated with an increased frequency of chromatid fragments in the blood lymphocytes of group 2 workers ($p = 0.03$).

Conclusion: The status of methylation of the *Bak1* promoter in human blood lymphocytes under chronic low-intensity ionizing radiation does not change, but it is observed to depend on the radiation dose and is associated with an increased frequency of chromosomal aberrations (chromatid fragments). Thus, the unmethylated *Bak1* promoter prevails when the external radiation dose is increased. An increase in the frequency of chromatid fragments is associated with an unmethylated *Bak1* promoter. In addition, exposure to chronic low-intensity external radiation is accompanied by a decrease in the frequency of chromosomal fragments in the blood lymphocytes of workers of the Siberian Group of Chemical Enterprises.

Key words: chromosomal aberrations, methylation of promoters, apoptosis, chronic external irradiation, low dose rate

For citation: Tsymbal OS, Isubakova DS, Bronikovskaya EV, Milto IV, Khalyuzova MV, Litviakov NV, Takhaouov RM. The Role of *Bak1* Methylation in the Induction of Chromosomal Aberrations under Chronic Low-Intensity External Radiation. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):29-34. (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-29-34

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Мазурик ВК. Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов. Радиационная биология. Радиоэкология. 2005;45(1):26-45. [Mazurik VK. The role of regulatory networks of cell response to damage in the formation of radiation effects. Radiation Biology. Radioecology. 2005;45(1):26-45. (In Russ.).]
2. Варга ОЮ, Рябков ВА. Апоптоз: понятие, механизмы реализации, значение. Экология человека. 2006;(7):28-32. [Varga OYu, Ryabkov VA. Apoptosis: concept, mechanisms of implementation, meaning. Human Ecology. 2006;(7):28-32. (In Russ.).]
3. Грабовский ЕВ, Олейник ГМ, Крастелев ЕГ, Смирнов ВП, Хмелевский ЕВ, Боженко ВК и др. Анализ индукции апоптоза лимфоцитов периферической крови человека сверхинтенсивным гамма-излучением *in vitro*. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2017;(6):59-66. [Grabovsky EV, Oleinik GM, Krastelev EG, Smirnov VP, Khmelevsky EV, Bozhenko VK, et al. Analysis of induction of apoptosis of human peripheral blood lymphocytes by super-intense gamma radiation *in vitro*. Bulletin of the Russian State Medical University. 2017;(6):59-66. (In Russ.).]
4. Литвяков НВ, Карпов АВ, Тахауов РМ, Фрейдин МБ, Сазонов АЭ, Халюзова МВ. Генетические маркеры индивидуальной радиочувствительности человека. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2011. 186 с. [Litviakov NV, Karpov AV, Takhaouov RM, Freydin MB, Sazonov AE, Khalyuzova MV. Genetic markers of individual human radio sensitivity. Tomsk: Tomsk University Press; 2011. p. 186. (In Russ.).]
5. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(1):105-10. DOI: 10.1073/pnas.0408352102.
6. Struijk L, van der Meijden E, Kazem S, ter Schegget J, de Gruijl FR, Steenbergen RDM, et al. Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. J Gen Virol. 2008;89(9):2303-14. DOI: 10.1099/vir.0.83317-0.
7. Cartron P-F, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM. Nonredundant role of Bax and Bak in bid-mediated apoptosis. Mol Cell Biol. 2003;23(13):4701-12. DOI: 10.1128/MCB.23.13.4701-4712.2003.
8. Choi SY, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Soh JW, et al. Activation of Bak and Bax through c-Abl-protein kinase C δ -p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. J Biol Chem. 2006;281(11):7049-59. DOI: 10.1074/jbc.M512000200.
9. Пендина АА, Гринкевич ВВ, Кузнецова ТВ, Баранов ВС. Метилирование ДНК – универсальный механизм регуляции активности генов. Экологическая генетика. 2004;2:27-8. [Pendina AA, Grinkevich VV, Kuznetsova TV, Baranov VS. DNA Methylation – a universal mechanism for regulating gene activity. Ecol Genetics. 2004;2:27-8. (In Russ.).]
10. Mathios D, Hwang T, Xia Y, Phallen J, Rui Y, See AP, et al. Genome-wide investigation of intragenic DNA methylation identifies ZMIZ1 gene as a prognostic marker in glioblastoma and multiple cancer types. Int J Cancer. 2019;145(12):3425-35. DOI: 10.1002/ijc.32587.
11. Qiu Y, Gao Y, Yu D, Zhong L, Cai W, Ji J, et al. Genome-wide analysis reveals zinc transporter ZIP9 regulated by DNA methylation promotes radiation-induced skin fibrosis via the TGF- β signaling pathway. J Invest Dermatol. 2020;140(1):94-102.e7. DOI: 10.1016/j.jid.2019.04.027.
12. Petrenko A, Eshilev E, Kisselova N. Identification of CpG islands hypermethylated in tumor and transformed cells by the methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. Mol Biol. 2012;34(3):408-12. DOI: 10.1007/BF02759673.
13. Кузьмина НС, Мязин АЕ, Лаптева НШ, Рубанович АВ. Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Радиационная биология. Радиоэкология. 2014;54(2):127-39. [Kuzmina NS, Myazin AE, Lapteva NS, Rubanovich AV. Study of aberrant methylation in blood leukocytes of liquidators of the chernobyl accident. Radiation Biology. Radioecology. 2014;54(2):127-39. (In Russ.).]
14. Azimian H, Bahreini-Toossi MT, Rezaei AR, Rafatpanah H, Hamzehloei T, Fardid R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. J Med Phys. 2015;40(1):38-44. DOI: 10.4103/0971-6203.152249.
15. Mirabello L, Kratz CP, Savage SA, Greene MH. Promoter methylation of candidate genes associated with familial testicular cancer. International J Mol Epidemiol Gen. 2012;3(3):213-27.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года». Государственный контракт № 56.001.20.2 от 03 июня 2020 г.

Financing. The study was carried out with the financial support of the Federal target program «Ensuring nuclear and radiation safety for 2016–2020 and for the period up to 2030». State contract No. 56.001.20.2 dated June 03, 2020

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 29.09.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 29.09.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Tsymbal O.S. <https://orcid.org/0000-0002-2311-0451>.

Isubakova D.S. <https://orcid.org/0000-0002-5032-9096>.

Bronikovskaya E.V. <https://orcid.org/0000-0002-6486-5025>.

Milto I.V. <http://orcid.org/0000-0002-9764-4392>.

Khalyuzova M.V. <https://orcid.org/0000-0002-4213-0765>.

Litviakov N.V. <http://orcid.org/0000-0002-0714-8927>.

Takhaouov R.M. <https://orcid.org/0000-0002-1994-957X>.

А.И. Горский, М.А. Максютлов, К.А. Туманов, Е.В. Кочергина, Н.С. Зеленская, В.К. Иванов**ПРОГНОЗ СМЕРТНОСТИ В КОГОРТЕ РОССИЙСКИХ УЧАСТНИКОВ
ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС**Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава
РФ, Обнинск

Контактное лицо: Антон Игоревич Горский, gorski@nrcr.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Анализ и прогноз динамики смертности, отдельных причин смерти и структуры смертности в когорте мужчин — ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС за период наблюдения с 1992 по 2017 гг.

Материал и методы: В анализе смертности и для прогноза использованы персональные данные по смертности ликвидаторов за период наблюдения 1992–2017 гг., накопленные в Национальном радиационно-эпидемиологическом регистре (НРЭР). В когорту наблюдения включены ликвидаторы 1986–1987 гг. въезда в зону облучения, получившие документированную в НРЭР дозу. Численность когорты в 1992 г. составляла 72432 человека, средняя доза — 130,8 мГр. За период наблюдения в когорте зафиксировано 27051 случай смерти, из них: злокачественные новообразования (ЗНО) — 4621, болезни системы кровообращения (БСК) — 11410, травмы и отравления (ТО) — 5110, остальные, кроме перечисленных (другие), — 5910. Для прогноза смертности и ее структуры использованы возрастные показатели интенсивности парциальных процессов смертности и смертности в целом, полученные за период наблюдения.

Результаты: Прогнозируемая численность когорты в 2030 г. — 22000 человек. Структура смертности в 2017 г.: ЗНО — 17 %, БСК — 42 %, ТО — 19 %, другие — 22 %. Прогнозируемая структура в 2030 г.: ЗНО — 24 %, БСК — 49 %, ТО — 11 %, другие — 16 %. Средняя ожидаемая продолжительность предстоящей жизни членов когорты в 2017 г. составляет 11,1 года (средний возраст ликвидаторов в 2017 г. — 62,4 года), тогда ожидаемая продолжительность жизни ликвидаторов с 2017 г. составит 73,5 года. Ожидаемая продолжительность жизни когорты ликвидаторов с показателями смертности 2017 г. для мужского населения России населения равна 70,4 года. Наблюдаемый эффект увеличения продолжительности жизни ликвидаторов может быть обусловлен эффектом «здоровых рабочих», мерами социальной поддержки, включая специализированную диспансеризацию, а также нельзя исключить и влияние естественного отбора.

Заключение: Проведенный анализ для рассматриваемой популяции служит инструментом для проведения мероприятий по повышению эффективности специализированной медицинской помощи ликвидаторам. Результаты данного исследования полезны для анализа смертности замкнутых (фиксированных по численности в определенный момент) популяций, подвергшихся воздействию вредных для здоровья техногенных факторов.

Ключевые слова: ликвидаторы последствий аварии на ЧАЭС, прогноз смертности, Национальный радиационно-эпидемиологический регистр, структура смертности, злокачественные новообразования, болезни системы кровообращения, травмы и отравления, средняя продолжительность жизни

Для цитирования: Горский А.И., Максютлов М.А., Туманов К.А., Кочергина Е.В., Зеленская Н.С., Иванов В.К. Прогноз смертности в когорте российских участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):35-41.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-35-41

Введение

Основным источником информации о динамике состояния здоровья облученных лиц и о медицинских радиологических последствиях аварии на ЧАЭС в Российской Федерации является Национальный радиационно-эпидемиологический регистр (НРЭР), созданный в 1986 г. сразу после аварии по решению Правительства Советского Союза. НРЭР представляет собой государственную информационную систему персональных данных граждан, подвергшихся воздействию радиации вследствие катастрофы на Чернобыльской АЭС, других радиационных аварий, ядерных испытаний и иных радиационных катастроф и инцидентов. Одной из основных целей НРЭР является прогнозирование медицинских радиологических последствий для облученного населения России.

В настоящее время в НРЭР зарегистрировано около 200 тыс. ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (далее — ликвидаторы), которые являются самой облученной категорией среди всех категорий граждан, подвергшихся радиационному воздействию в результате аварии на ЧАЭС. Средняя доза внеш-

него облучения, полученная ликвидаторами за период участия в аварийных работах, составляет около 100 мГр.

Ликвидаторы живут практически во всех регионах России, поэтому когорта ликвидаторов является достаточно репрезентативной выборкой, позволяющей адекватно оценить состояние здоровья мужского взрослого населения РФ в соответствующих возрастных диапазонах. Напомним, что мужчины составляют подавляющую (97 %) часть общей когорты ликвидаторов.

Рассматриваемая в настоящей статье когорта является замкнутой (с фиксированной численностью в определенный момент времени) и изучение динамических, демографических характеристик когорты актуально для анализа смертности в замкнутых популяциях, подвергшихся воздействию вредных техногенных факторов.

Основной целью данной работы является прогноз динамики и структуры смертности в когорте ликвидаторов, который будет определять стратегию мероприятий практического здравоохранения в будущем для этой категории населения РФ.

Таблица 1

Характеристики когорты ликвидаторов для анализа смертности
Description of the of emergency clean up workers cohort used for mortality analysis

Характеристика	Значение
Регистрация в НРЭР	до 01.01.1992 г.
Годы въезда в зону аварии	1986–1987
Пол	мужской
Возраст на момент въезда, лет	18–70
Наличие данных о состоянии здоровья с 01.01.1992 по 31.12.2017 гг.	да
Наличие документированной дозы облучения	да
Средняя документированная доза, мГр	131
Интервал документированных доз, мГр	1–700
Период наблюдения, годы	1992–2017
Общая численность в когорте наблюдения (на 1992 г.), человек	72432 (100 %)
Число умерших и выбывших из наблюдения за весь период, человек	35314 (49 %)
Общее число смертей от всех причин	27051 (37 %)
Число смертей от злокачественных новообразований (ЗНО)	4621 (17 %)
Число смертей от болезней системы кровообращения (БСК)	11410 (42 %)
Число смертей от травм и отравлений (ТО)	5110 (19 %)
Число остальных смертей (кроме ЗНО, БСК и ТО)	5910 (22 %)

Материал и методы

Исходными данными для анализа являются результаты наблюдения за ликвидаторами (жителями России), накопленные в НРЭР за период с 1992 по 2017 гг., приведенные в табл. 1.

Смертность является основным индикатором состояния здоровья популяции. Процесс смертности представляет собой цепочку времен и типов событий. События можно рассматривать как переход из одного состояния в другое, в рамках описания истории событий часто используются модели со многими состояниями (multi-state models), которые описаны, например, в [1–4]. Рассмотрим основные модели, используемые в анализе процессов заболеваемости и смертности.

Модель процесса смертности с двумя состояниями

Наиболее простая модель двух состояний с одним переходным состоянием «0:жив» и терминированным состоянием «1:умер», из которого переходы в другие состояния невозможны (рис. 1).

Наблюдения за данным индивидуумом в этом случае будут иметь простую форму в виде одной случайной переменной T , представляющей время от начала наблюдения до появления события «смерть». Переменную T можно определить через функцию распределения вероятности $F(t) = \text{Prob}(T \leq t)$ или через функцию вероятности остаться живым $S(t) = 1 - F(t) = \text{Prob}(T > t)$. Если индивидуум был в состоянии 0 в момент времени $t = 0$, тогда $F(t)$ — вероятность

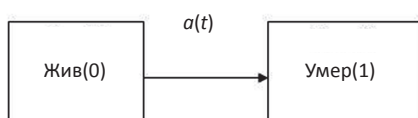


Рис. 1. Модель процесса смертности с двумя состояниями
 Fig. 1. Model of mortality from two concomitant events

перехода из состояния 0 в состояние 1 за интервал времени от 0 до t . Если время наблюдения непрерывно, распределение T можно выразить через функцию интенсивности риска (hazard rate function):

$$\alpha(t) = -\frac{d}{dt} \cdot \ln S(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\text{Prob}(T \leq t + \Delta t | T \geq t)}{\Delta t}. \quad (1)$$

Таким образом $\alpha(\cdot)$ — интенсивность перехода из состояния 0 в состояние 1 есть вероятность перейти из состояния 0 в состояние 1 в единицу времени.

Из выражения (1) следует, что вероятность остаться живым равна:

$$S(t) = \exp\left(-\int_0^t \alpha(u) \cdot du\right). \quad (2)$$

Модель процесса смертности с конкурирующими рисками

Как правило, процесс изменения численности когорты во времени сопровождается несколькими причинами смерти, кроме того, часть членов когорты выбывает из-под наблюдения вследствие потери наблюдения в рассматриваемый период времени. В этом случае имеется одно переходное состояние «0» и число k терминальных (поглощающих) состояний h , $h = 1, 2, \dots, k$, соответствующих смерти от разных причин и потери наблюдения. Таким образом, мы имеем $p = k + 1$ состояний. Модель иллюстрируется на рис. 2.

Интенсивности перехода $\alpha_{0,h}(t)$ для $h = 1, 2, \dots, k + 1$ определяются для причины выхода из наблюдения h из функции риска:

$$\alpha_h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\text{Prob}(\text{смерть (выход) от причины } h \text{ при } t + \Delta t | T \geq t)}{\Delta t}, \quad (3)$$

где T — время наблюдения, при этом $\alpha_{h,j} = 0$ для всех $h \neq 0$ и всех j .

Вероятность быть под наблюдением в интервал времени от 0 до t для k причин выбытия выразится формулой:

$$P_{00}(0, t) = S(t) = \text{Prob}(T > t) = \exp\left(-\int_0^t \sum_{h=1}^k \alpha_h(u) \cdot du\right). \quad (4)$$

В принципе модель можно использовать для прогноза заболеваемости, если заболеваемость рассматривать как хроническую (терминальное со-

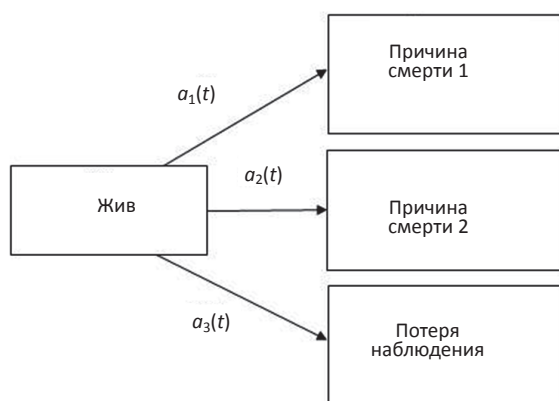


Рис. 2. Модель процесса смертности конкурирующих рисков для двух причин смерти и потери наблюдения

Fig. 2. Model of mortality from concurrent risks of two causes of death and the loss to follow-up

стояние) и использовать вероятность перехода для забораемости.

Моделирование процессов смертности проведем с учетом накопленной информации о каждом ликвидаторе в несколько этапов:

1. Моделирование интенсивности каждого изучаемого процесса.

2. Моделирование возрастной структуры когорты.

3. Моделирование динамики и годового числа событий рассматриваемого процесса и их прогноз.

Рассмотрим основные процессы, которые определяют изменение численности наблюдаемой когорты во времени:

1. Потеря наблюдения за ликвидаторами.

2. Смертность от всех причин, включая: смертность от солидных раков (коды МКБ-10 C80–C81); смертность от болезней системы кровообращения (коды МКБ-10 I00–I99); смертность от травм и отравлений (коды МКБ-10 S00–T98); смертность от причин, кроме перечисленных.

Наблюдаемая зависимость интенсивности определенного процесса $\lambda^h(u)$ от возраста u моделировалась полиномом третьей степени с использованием подгонки методом Левенберга–Маккардта [5, 6]:

$$\lambda^h(u) = \frac{\sum_j c_j^h(u)}{\sum_j pyr_j(u)} = k_0^h + k_1^h \cdot u + k_2^h \cdot u^2 + k_3^h \cdot u^3, \quad (5)$$

где $c_j^h(u)$ — количество случаев смерти от причины h в календарном году j ; $pyr_j(u)$ — число человеко-лет

наблюдения в календарном году j . Суммирование ведется по всем годам наблюдения с 1992 по 2017 гг.

Коэффициенты полинома для всех рассматриваемых процессов выбытия ликвидаторов из-под наблюдения приведены в табл. 2.

Имея интенсивность выбытия ликвидаторов из-под наблюдения от всех причин, можно смоделировать динамику возрастной структуры n наблюдаемой когорты ликвидаторов через время наблюдения t , используя функцию $P_{00}(g, t)$ (4), которая представляет долю ликвидаторов, статус которых известен, как «жив» с возраста g до момента времени t (возраста $g + t$):

$$n(g + t, t) = N(g, 0) \times P_{00}(g, t), \quad (6)$$

где $N(g, 0)$ — численность ликвидаторов возраста g в 1992 г.

Ожидаемая средняя продолжительность жизни (LT) является важным показателем здоровья когорты или популяции людей. Величина LT, как функция времени, рассчитывалась как:

$$LT = \sum_{g=a \min}^{a \max} \varepsilon_{g, 2017} \cdot (g + \int_g^{a \max} P_{00}(x, a \max - x) \cdot dx), \quad (7)$$

где $a \min$ ($a \max$) — минимальный (максимальный) возраст членов когорты в 2017 г.; $\varepsilon_{g, 2017}$ — доля численности ликвидаторов возраста g в 2017 г. от полной численности когорты. Интеграл в формуле (7) моделирует продолжительность предстоящей жизни после 2017 г. для ликвидаторов возраста g .

Для сглаживания временных колебаний с целью оценки тренда структуры смертности использована кумулятивная сумма, и вклад определенной причины h смерти $\omega_{0,h}$ определялся как:

$$\omega_{0,h}(t) = P_{0,h}(t) / \sum_h P_{0,h}(t), \quad (8)$$

где $P_{0,h}(t)$ — моделированное или фактическое кумулятивное число случаев смерти от причины h в момент времени t ; $\sum_h \omega_{0,h}(t) = 1$ в любой момент времени.

Результаты

Рис. 3 иллюстрирует фактические данные и их моделирование для интенсивности выбытия по возрасту от всех причин, динамику наблюдаемой когорты и ее прогноз до 2030 г. Как следует из рис. 3, модель (5) адекватно описывает данные наблюдений по интенсивности и численности рассматриваемой

Таблица 2

Коэффициенты моделей интенсивности рассматриваемых процессов

Factors of models for processes intensity

Причины потери наблюдения	Коэффициенты			
	k_0	k_1	k_2	k_3
Все причины выбытия	$1,48 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-4}$	$2,56 \times 10^{-6}$	$2,41 \times 10^{-8}$
Смертность от всех причин	$3,86 \times 10^{-5}$	$-3,91 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$-8,32 \times 10^{-8}$
Смертность от ЗНО	$4,16 \times 10^{-6}$	$7,01 \times 10^{-5}$	$-5,30 \times 10^{-6}$	$9,75 \times 10^{-8}$
Смертность от ТО	$-1,06 \times 10^{-5}$	$-5,49 \times 10^{-5}$	$7,60 \times 10^{-6}$	$-9,72 \times 10^{-8}$
Смертность от БСК	$1,33 \times 10^{-5}$	$-7,40 \times 10^{-5}$	$9,90 \times 10^{-7}$	$6,49 \times 10^{-8}$
Остальные причины смерти	$4,03 \times 10^{-6}$	$-1,57 \times 10^{-4}$	$7,92 \times 10^{-6}$	$-6,27 \times 10^{-8}$

Примечание: ЗНО — злокачественные новообразования; ТО — травмы и отравления; БСК — болезни системы кровообращения

когорты. Например, в возрасте 60 лет интенсивность выбытия составляет 32 случая на 1000 человек в год, в 2030 г., согласно прогнозу, ожидается численность когорты примерно в 22000 человек, ожидаемое время существования когорты после 2017 г. составит примерно 25 лет.

Результаты моделирования возрастной структуры на начало наблюдения в 1992, 2017 и 2030 г. представлены на рис. 4. Результаты, приведенные на рис. 4, подтверждают корректное моделирование возрастной структуры через 25 лет после начала наблюдения с использованием модели интенсивности всех потерь наблюдения за ликвидаторами.

Смертность от всех причин и ее прогноз

Модель интенсивности смертности от всех причин в зависимости от возраста и данные наблюдений по интенсивности приведены на рис. 5. На этом же рисунке справа приведена динамика годовой смертности и ее прогноз до 2030 г. Как следует из рис. 5, модель интенсивности хорошо описывает фактические данные. По данным прогноза, в 2030 г. ожидается около 42000 смертей от всех причин.

Смертность от отдельных причин (ЗНО, БСК, ТО и остальные)

Модельная и фактическая интенсивность смерти и динамика кумулятивной смертности от ЗНО иллюстрируется рис. 6.

Смертность от БСК является одной из основных причин смерти в современных популяциях. На рис. 7

приведена интенсивность смерти и динамика кумулятивной смертности (правый рисунок) от БСК. Как следует из рис. 6, 7, для смертности от ЗНО и БСК наблюдается хорошее согласие наблюдений с моделью.

Травмы и отравления играют заметную роль в структуре общей смертности ликвидаторов (табл. 1). Интенсивность смерти и годовая смертность от этой причины приводится на рис. 8. Если для других причин смерти интенсивность растет с возрастом, то для травм и отравлений зависимость имеет сложную форму с максимумом в возрасте 50 лет.

Наблюдаемая кумулятивная смертность на рис. 8 превышает прогнозные оценки в период с 2000 по 2005 гг. и отражает повышенный рост смертности от травм и отравлений в этот период. Напомним, что прогноз основан на интенсивностях, составляющих смертность процессов за весь период наблюдения. Причина наблюдаемого роста смертности требует дополнительного изучения.

Интенсивность смертности и годовая смертность от других причин иллюстрируется рис. 9.

Наблюдаемая и модельная структура смертности по рассматриваемым причинам приведена на рис. 10. Согласно данным прогноза, приведенным на рис. 10, в 2017 г. доля смертности от ЗНО и смерти от травм и отравлений составляет 18 %, для БСК — 42 % и для других причин смерти — 22 %. Вклад травм и отравлений уменьшается во времени (11 % в 2030 г.), вклад случаев смерти от ЗНО увеличивается, достигая в

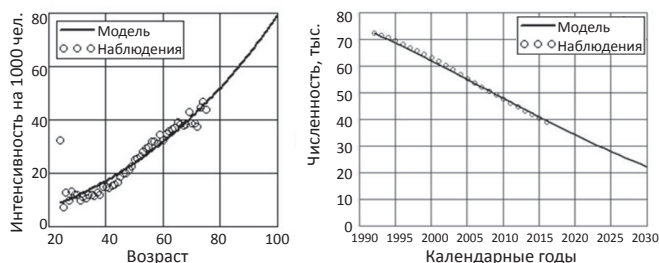


Рис. 3. Модель и фактические данные интенсивности выбытия ликвидаторов из наблюдения от всех причин и динамика численности когорты

Fig. 3. Model and actual data on rates of all-case loss to follow-up of emergency clean-up workers and dynamics of the cohort size

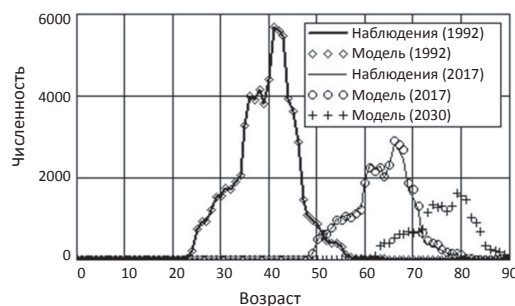


Рис. 4. Динамика возрастной структуры когорты, фактические данные и их моделирование

Fig. 4. Dynamics of the cohort age structure: actual and modeling data

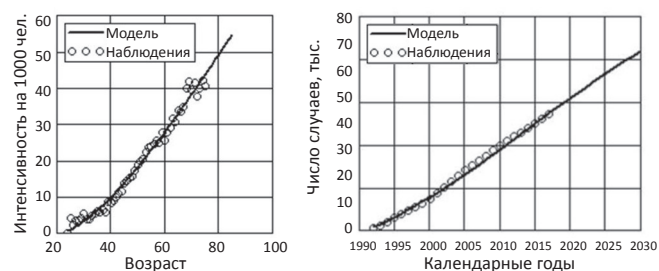


Рис. 5. Интенсивность смертности от всех причин в зависимости от возраста и динамика кумулятивной смертности

Fig. 5. Age-specific all-cause mortality rates and dynamics of cumulative mortality

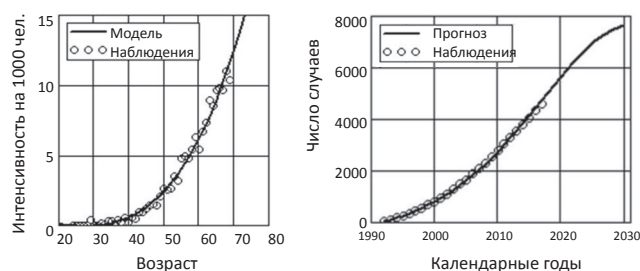


Рис. 6. Интенсивность смертности от ЗНО в зависимости от возраста и динамика кумулятивной смертности

Fig. 6. Age-specific mortality rate and dynamics of cumulative mortality from malignant neoplasms

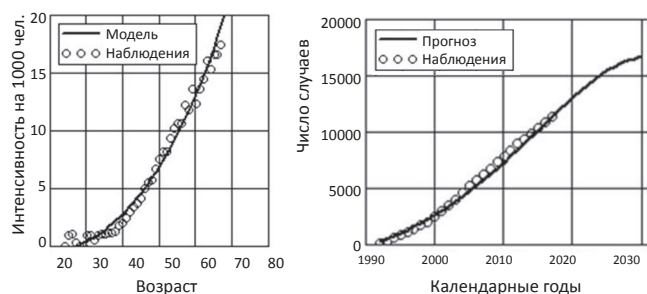


Рис. 7. Интенсивность смертности в зависимости от возраста и динамика кумулятивной смертности от БСК
Fig. 7. Age-specific mortality rate and dynamics of cumulative mortality from circulatory diseases

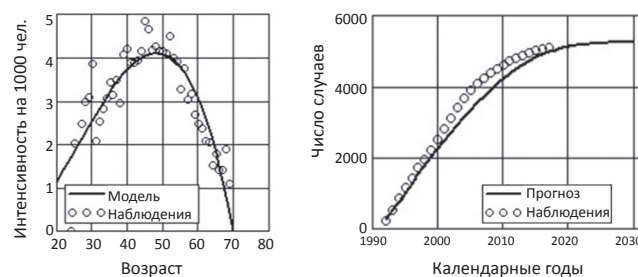


Рис. 8. Интенсивность смертности в зависимости от возраста и динамика кумулятивной смертности от ТО
Fig. 8. Age-specific mortality rate and dynamics of cumulative mortality from traumas and poisoning

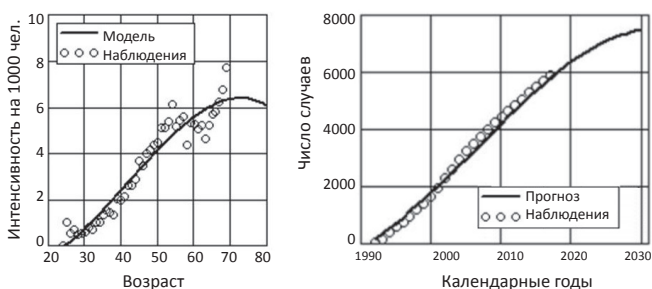


Рис. 9. Интенсивность смертности в зависимости от возраста и динамика кумулятивной смертности от всех причин, кроме ЗНО, ТО и БСК
Fig. 9. Age-specific mortality rate and dynamics of cumulative mortality from all causes except above mentioned diseases

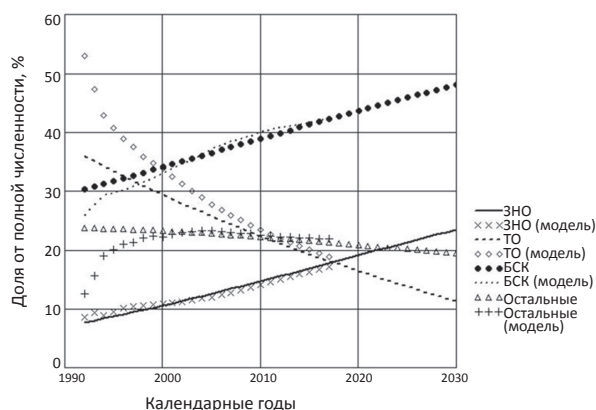


Рис. 10. Динамика структуры смертности ликвидаторов
Fig. 10. Dynamics of emergency clean-up workers mortality structure

2030 г. 23 %, при этом доля случаев смерти от БСК составит 48 %, а от других причин — 18 %.

Средняя ожидаемая продолжительность предстоящей жизни членов когорты в 2017 г. составляет 11,1 года (средний возраст ликвидаторов в 2017 г. — 62,4 года), тогда прогнозируемая ожидаемая продолжительность жизни ликвидаторов с 2017 г. составит 73,5 года. Ожидаемая продолжительность жизни когорты ликвидаторов с показателями смертности 2017 г. для мужского населения России населения равна 70,4 года. Наблюдаемый эффект увеличения продолжительности жизни может быть обусловлен эффектом «здоровых рабочих», мерами социальной поддержки, включая специализированную диспансеризацию, а также нельзя исключить и влияние естественного отбора.

Проведенное моделирование хорошо описывает результаты наблюдений. В табл. 3 приведены наблюдаемые и модельные числа случаев для рассматриваемых причин смерти за период с 1992 по 2017 гг. Максимальное отличие в числе случаев наблюдается для смерти от ЗНО и не превышает 3 %.

Обсуждение

Анализ и моделирование процессов смертности в когорте ликвидаторов показывают, что модели адекватно описывают процессы смертности за период наблюдения с 1992 по 2017 гг., что дает основания для

надежности прогнозных оценок смертности в предстоящие 10–15 лет. Ожидаемая средняя продолжительность жизни ликвидаторов в рассматриваемой когорте с 2017 г. равна 73,5 года, в то же время ожидаемая средняя продолжительность жизни в этой же когорте, но с российскими возрастными показателями смертности, равна 70,4 года, то есть смертность в когорте ликвидаторов меньше, чем в референсной группе населения РФ.

В соответствии с современными научными представлениями среди наблюдаемого числа смертей в исследуемой когорте ликвидаторов определенную долю составляют случаи, индуцированные облучением. Для приближенной оценки доли радиогенных случаев используем результаты исследований смертности ликвидаторов, зарегистрированных в НРЭР, приведенных в публикациях [7–9], где сделаны оценки радиационных рисков смертности для солидных раков для ЗНО и БСК.

В публикации [7] проведен анализ смертности и дозовой зависимости смертности в когорте ликвидаторов, работавших в зоне облучения в течение года после аварии. Для оценки зависимости риска смерти от дозы облучения использованы непараметрические методы анализа выживаемости с учетом конкуренции рисков смерти. Исследована смертность от ЗНО и БСК в когорте ликвидаторов (период наблюдения 1992–2012 гг.). В анализе использована

Таблица 3

**Модельные и фактические значения
кумулятивного числа случаев
за период 1992–2017 гг.**

Modeling and actual data of cumulative number of cases

Причина смерти	Наблюдения	Моделирование
ЗНО	4621	4765
ТО	5110	5019
БСК	11410	11420
Другие	5910	5819
Все причины смерти	27051	27023

Примечание: ЗНО — злокачественные новообразования; ТО — травмы и отравления; БСК — болезни системы кровообращения

накопленная за 1992–2012 гг. информация о ликвидаторах (мужчинах), работавших в зоне облучения с 26 апреля 1986 по 26 апреля 1987 гг. со средними дозами 0,17 Гр. Угловым коэффициент зависимости доза-эффект, нормированный на дозу 1 Гр, для отношения рисков в линейной модели для раков равен 0,47 (95 % ДП: -0,77; 1,71), для системы кровообращения — 0,22 (95 % ДП: -0,58; 1,02).

В публикации [8] исследуемая когорта практически идентична рассматриваемой когорте с тем же периодом наблюдения (1992–2017 гг.) со средними дозами 0,13 Гр. В рамках линейной модели зависимости смертности от дозы облучения получены статистически значимые оценки коэффициента избыточного относительного риска на единицу дозы (ERR/Gr) для всех солидных раков $ERR/Gr = 0,63$; 95 % ДИ (0,19; 1,11); $p = 0,004$.

В публикации [9] анализ статистических связей доз облучения и структуры причин смерти среди ликвидаторов проведен методами Data Mining, свободными от априорных предположений о вероятностных распределениях доз и диагнозов. Рассмотрены статистические связи смертности с дозой облучения на уровне классов заболеваний, рубрик и отдельных диагнозов. Для анализа использованы таблицы сопряженности случаев смерти, дозы облучения и возраста. Статистически значимый положительный тренд (отношение шансов) по дозе облучения в одинаковых возрастных категориях наблюдается для классов «Злокачественные новообразования» (класс С МКБ-10) и «Болезни системы кровообращения» (класс I).

Приближенное число радиогенных случаев смерти для солидных раков и БСК определим с использованием приведенных значений избыточного относительного риска на 1 Гр (ERR/Gr). Относительный риск за период наблюдений $RR = O/E = 1 + (ERR/Gr) \times d$, где O — наблюдаемое число случаев смерти; E — ожидаемое число при отсутствии облучения; d — средняя доза в когорте. Тогда ожидаемое число случаев равно $E = O / (1 + (ERR/Gr) \times d)$, а разность $O - E$ даст число радиогенных случаев смерти. Для солидных раков число случаев смерти за период наблюдения — 4621, из них вычтем смерти, которые случились во время латентного периода 10 лет (до 1996 г.), — 350 смер-

тей, ERR/Gr в публикации [7] равен 0,47 (доза 0,17 Гр), а в публикации [8] он равен 0,63 (доза 0,13 Гр). Тогда число радиогенных случаев смерти от солидных раков будет: $4271 - 4271 / (1 + 0,47 \times 0,17) = 316$ и $4271 - 4271 / (1 + 0,63 \times 0,13) = 323$, что практически одинаково в обоих случаях. Если использовать прогнозные оценки числа случаев до 2030 г. при условии, что ERR/Gr останется прежним, получим значения 544 (7,4 % из общего числа смертей от ЗНО) и 556 (7,6 %) случаев соответственно.

Условно принимая, что латентный период для БСК также равен 10 лет, получим к 2017 г. 372 случая от радиогенных БСК и прогноз 603 случаев к 2030 г. Т.е. прогнозируемая доля радиогенных случаев смерти от БСК к 2030 г. будет составлять 3,7 % из общего прогнозируемого числа смертей от БСК. Таким образом, прогнозируемая общая доля радиогенных случаев смерти (от ЗНО и БСК суммарно) к 2030 г. будет составлять около 3,1 % от общего числа прогнозируемых случаев смерти.

Следует отметить, что в представленном в данной статье анализе не учтены некоторые факторы, которые могут повлиять на точность результатов. Не учтен временной тренд показателей интенсивности процессов смертности, а использованы результаты наблюдений за весь период с 1992 по 2017 гг. Тем не менее, использованный подход моделирует динамику возрастной структуры когорты с достаточной точностью.

На точность оценки ожидаемой продолжительности жизни и прогноза динамики когорты может повлиять малое количество случаев для ликвидаторов возрастом свыше 75 лет и связанная с этим большая девиация в интенсивности смертности. Кроме того в анализе не учтена информация о ликвидаторах, наблюдение за которыми было потеряно (неявка на диспансеризации, миграция), что может также повлиять на точность проведенного анализа.

Выводы

1. В структуре смертности в 2017 г. доминантной является смертность от БСК (42 %), от ЗНО (18 %), от ТО (18 %) и от всех причин, кроме перечисленных (22 %). Согласно прогнозу на 2030 г., доля смертей будет расти от БСК (48 %), от ЗНО (24 %), уменьшаться — от ТО (11 %) и других причин (18 %).

2. Средняя продолжительность жизни ликвидаторов, имеющих в регистре статус «жив» в 2017 г., равна 73,5 года, тогда как эта же величина, рассчитанная с показателями смертности мужского населения РФ, равна 70,4 года. Эффект увеличения продолжительности жизни в когорте ликвидаторов можно объяснить эффектом «здоровых рабочих», мерами социальной поддержки, включая специализированную диспансеризацию и выбыванием со временем из замкнутой когорты ликвидаторов с повышенной уязвимостью здоровья.

3. Прогнозируемая общая доля радиогенных случаев смерти (от ЗНО и БСК суммарно) к 2030 г. будет составлять около 3,1 % от общего числа прогнозируемых случаев смерти.

Prognostic Analysis of Mortality in the Cohort of the Chernobyl Cleanup Workers

A.I. Gorski, M.A. Maksoutov, K.A. Tumanov, E.V. Kochergina, N.S. Zelenskaya, V.K. Ivanov

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Obninsk, Russia

ABSTRACT

Purpose: Analysis and prognosis of mortality rate, specific causes of death and mortality structure in the male cohort of the Chernobyl cleanup workers monitored from 1992 over 2017.

Materials and methods: Analysis and prognosis of mortality among the Chernobyl cleanup workers for the follow up period 1992–2017 were based on personal death records stored at the National Radiation Epidemiological Registry (NRER). The workers entered the exclusion zone in 1986 and in 1987, who had documented dose records were included in the monitoring cohort. In 1992 the cohort size was 72432 persons, average radiation dose was 130.8 mGy. For the period of the cohort monitoring 27051 cleanup workers died with the following causes of death: malignant neoplasms — 4621 cases, circulatory diseases — 11410 cases, traumas and poisoning — 5110 cases, other — 5910. To prognose mortality and mortality structure data on age-specific intensity of partial mortality and total mortality during the monitoring period were used.

Results: The predicted size of the cohort will be 22,000 persons in 2030. Mortality structure in 2017: malignant neoplasms — 17 %; circulatory diseases — 42 %; traumas and poisoning — 19 %, other — 22 %. The mortality structure in 2030 will be: malignant neoplasms — 24 %; circulatory diseases — 49 %; traumas and poisoning — 11 %, other — 16 %. Cleanup workers' the average time left to live estimated in 2017 was 11.1 years (their average age in 2017 was 62.4 years), it means that their average life expectancy will be 73.5 years. Average life expectancy of Russian males is 70.4 years. Increased life span of the cleanup workers can be due to their good health, social support including regular special medical examination, the effect of the natural selection cannot be excluded as well.

Conclusion: Results of the study can serve as example of organization of high effective specialized medical examination of the Chernobyl cleanup workers. The research outcomes will be useful for analysis of mortality among members of a closed population following exposure to hazardous technogenic factors.

Key words: Chernobyl cleanup workers, prognosis of mortality, National Radiation Epidemiological Registry, non-parametric method of analysis, intensity of mortality, mortality risks concurrence, mortality structure, malignant neoplasms, circulatory diseases, traumas and poisoning, average lifespan

For citation: Gorski AI, Maksoutov MA, Tumanov KA, Kochergina EV, Zelenskaya NS, Ivanov VK. Prognostic Analysis of Mortality in the Cohort of the Chernobyl Cleanup Workers. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):35–41 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-35-41

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Andersen PK, Borgan O, Gill RD, Keiding N. Statistical models based on counting processes. New York: Springer-Verlag; 1993. 784 p.
- Hougaard P. Analysis of multivariate survival data. New York: Springer-Verlag; 2000. 542 p.
- Hougaard P. Multi-state models: a review. Lifetime Data Anal. 1999;5(3):239–64.
- Commenges D. Multi-state models in epidemiology. Lifetime Data Anal. 1999;5(4):315–27.
- Levenberg K. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. Quart. Appl. Math. 1944;2(2):164–8.
- Marquardt D. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. J Soc Indust Appl Math. 1963;11(2):431–41.
- Горский АИ, Максюттов МА, Туманов КА, Щукина НВ, Чекин СЮ, Иванов ВК. Непараметрический анализ радиационных рисков смертности среди ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Радиационная биология. Радиоэкология. 2016;56(2):138–48. [Gorski AI, Maksoutov MA, Tumanov KA, Shchukina NV, Chekin SYu, Ivanov VK. Non-parametric analysis of radiation risks of mortality among Chernobyl clean-up workers. Radiation Biology. Radioecology. 2016;56(2):138–48. (In Russ.)].
- Иванов ВК, Карпенко СВ, Кашеев ВВ, Чекин СЮ, Максюттов МА, Туманов КА и др. Радиационные риски российских участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС за период 1992–2017 гг. Часть II: смертность от солидных раков. Радиация и риск. 2020;29(1):18–31. [Ivanov VK, Karpenko SV, Kashcheev VV, Chekin SYu, Maksoutov MA, Tumanov KA, et al. Radiation risks of Russian liquidators of the Chernobyl accident for the period 1992–2017. Part II: Solid cancer mortality. Radiation and Risk. 2020;29(1):18–31. (In Russ.)].
- Горский АИ, Максюттов МА, Туманов КА, Кочергина ЕВ, Корело АМ. Статистические связи смертности ликвидаторов с дозой облучения. Радиация и риск. 2018;27(1):22–32. [Gorski AI, Maksoutov MA, Tumanov KA, Kochergina EV, Korelo AM. Association rules for discovery relationship between mortality among Chernobyl liquidators and radiation dose. Radiation and Risk. 2018;27(1):22–32. (In Russ.)].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 01.10.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 01.10.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Gorski A.I. <https://orcid.org/0000-0003-0272-0928>.
 Maksoutov M.A. <https://orcid.org/0000-0001-7229-0092>.
 Tumanov K.A. <https://orcid.org/0000-0003-0722-5408>.
 Kochergina E.V. <https://orcid.org/0000-0003-4925-9980>.
 Zelenskaya N.S. <https://orcid.org/0000-0003-0914-5401>.
 Ivanov V.K. <https://orcid.org/0000-0003-1372-0018>.

П.С. Кызласов¹, А.Т. Мустафаев¹, А.Н. Башков¹, Ю.Д. Удалов¹, Т.М. Топузов², А.Г. Мартов¹

КОМПЬЮТЕРНО-ТОМОГРАФИЧЕСКАЯ КАВЕРНОЗОГРАФИЯ — МЕТОД ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ ПАЦИЕНТОВ К ФАЛЛОЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЮ

¹ Медико-биологический университет инноваций и непрерывного образования (МБУ ИНО) Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна, Москва

² Городской центр эндоскопической урологии и новых технологий Клинической больницы Святителя Луки, Санкт-Петербург

Контактное лицо: Мустафаев Али Тельман оглы, dr.mustafayevat@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Оценить возможности компьютерно-томографической кавернозографии в определении размеров кавернозных тел для правильного подбора размеров фаллопротезов при предоперационной подготовке пациентов.

Материал и методы: 26 пациентов, которым было проведено эндофаллопротезирование с предоперационной подготовкой на основе компьютерно-томографической кавернозографии с целью определения размеров кавернозных тел.

Результаты: У 15 пациентов данные размеров по результатам кавернозографии совпали с истинными без погрешностей, у 11 погрешность составляла 0,5 см (которое компенсировалось насадками из комплекта). За время наблюдения осложнений после установки протезов, связанных с неправильным подбором размера, зафиксировано не было.

Заключение: Компьютерно-томографическая кавернозография является эффективным способом предоперационного планирования пациентов с целью уточнения размеров кавернозных тел и подбора нужного размера протеза. Данный метод позволяет с точностью до 0,5 см подобрать имплантат, что в свою очередь приведет к снижению рисков осложнений, связанных с неправильным подбором протезов, а также улучшить экономическую составляющую за счет снижения количества случаев, когда протез вскрывается вследствие неправильного подобранного размера.

Ключевые слова: эректильная дисфункция, фаллоэндопротезирование, компьютерная динамическая кавернозография

Для цитирования: Кызласов П.С., Мустафаев А.Т., Башков А.Н., Удалов Ю.Д., Топузов Т.М., Мартов А.Г. Компьютерно-томографическая кавернозография — метод предоперационной подготовки пациентов к фаллоэндопротезированию. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):42–4.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-42-44

Введение

По данным ряда авторов, распространенность эректильной дисфункции по всем странам примерно одинакова. Так, согласно клиническим рекомендациям Российского общества урологов 2019 г., в Российской Федерации эректильная дисфункция (ЭД) встречается у 48,9% мужчин в возрасте 20–77 лет. 34,6% мужчин страдают ЭД легкой степени, 7,2% — средней степени и 7,1% — тяжелой степени [1]. Также доказана связь между ЭД с заболеваниями других органов и систем (сердечно-сосудистой системы, неврологическими, эндокринными и др.), и зачастую лечение сопутствующих патологий приводит к улучшению эректильной функции [2, 3].

В настоящее время в арсенале у урологов, занимающихся лечением ЭД, есть множество методов коррекции данной патологии с различной степенью эффективности — от консервативных и физиотерапевтических до хирургических. Эффективность каждого из методов лечения в большей степени зависит от причины развития ЭД. Безусловно, лечение ЭД должно носить персонифицированный подход. Так, например, при патологическом сбросе крови через ножки полового члена или после радикальной простатэктомии консервативные методы лечения малоэффективны. А наиболее радикальным методом коррекции эректильной функции является фаллоэндопротезирование.

Фаллопротезирование как метод коррекции эректильной функции существует достаточно давно. Первые литературные упоминания о протезах полового члена относятся еще к XVI в., когда ученик

Леонардо да Винчи — Амбруаз Паре разработал наружный протез — приспособление, напоминающее современные наружные эректоры и жесткие презервативы [4]. Собственно, фаллоэндопротезирование зародилось в середине XX в., когда в 1936 г. русский профессор Н.А. Богораз впервые в мире выполнил операцию по имплантации реберного хряща в ранее сформированный из кожи живота неофаллос для придания последнему достаточной ригидности [5].

Современные фаллопротезы начали применяться с 1960 г., когда G.E. Beheri впервые использовал парные полиэтиленовые стержни, имплантировав их в каждое кавернозное тело полового члена [6]. На данный момент фаллоэндопротезирование является единственным радикальным методом коррекции ЭД, что дает более прогнозируемый эффект и позволяет удовлетворить ожидания 80–90% пациентов и их партнеров [7]. Основным недостатком данного метода является финансовая сторона вопроса. Учитывая анатомическую индивидуальность каждого человека, порой предугадать точный размер протеза до операции не представляется возможным. Обычно хирурги перед операцией берут с собой несколько комплектов фаллопротезов и интраоперационно подбирают нужный размер. Это, в свою очередь, создает определенные трудности, особенно если операции проводятся в дальних регионах нашей страны, где снабжение фаллопротезами клиник носит частный характер и производится индивидуально.

Целью нашего исследования была разработка метода измерения размеров кавернозных тел на предопе-

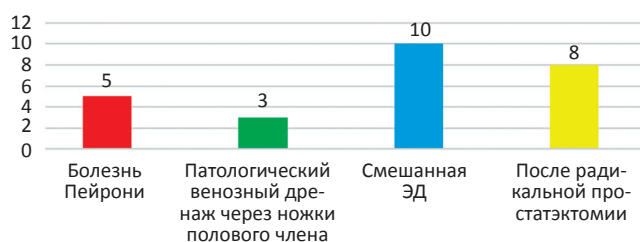


Рис. 1. Распределение пациентов на фаллоэндопротезирование
Fig. 1. Distribution of patients to penile prosthesis implantation by etiology

рационном этапе с целью определения точных размеров фаллопротеза. Учитывая более высокую точность и лучшую визуализацию по сравнению с другими методами исследования (УЗИ, МРТ, рентгенография полового члена), наш выбор пал на компьютерно-томографическую кавернозографию [8].

Материал и методы

В центре урологии и андрологии ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России с 2018 по 2019 гг. 26 пациентам выполнена операция в объеме фаллоэндопротезирования, при эректильной дисфункцией различной этиологии (рис. 1). Возраст пациентов в среднем составил 38 лет (от 24 до 63 лет). Из 26 пациентов у 5 причиной ЭД, требующей эндофаллопротезирования, была болезнь Пейрони, с прогрессирующим укорочением полового члена, у 3 пациентов по данным обследования выявлен патологический венозный дренаж через ножки полового члена, у 10 пациентов выявлена смешанная форма ЭД и у 8 пациентов ЭД развилась после проведенной радикальной простатэктомии. У всех пациентов, включенных в исследование, прием ИФДЭ-5 был не эффективен. С целью определения размеров кавернозных тел всем

пациентам была проведена динамическая компьютерно-томографическая кавернозография.

Измерения производились следующим способом: интракавернозно вводился препарат Каверджект 10 мкг, по истечении 10 мин (время раскрытия действия препарата, согласно официальной инструкции), проводилась интракавернозная перфузия рентгено-контрастным препаратом Урографин 76% до достижения полноценной эрекции (ER 4-5 по шкале Юнема). Далее проводили компьютерную томографию на многосрезовом компьютерном томографе Toshiba Aquilion 64 с толщиной слоя 1 мм, что позволяло получить при постпроцессинговой обработке данных качественные мультипланарные и трехмерные (3D) изображения. Построение 3D модели, а также измерение длины кавернозного тела проводили на рабочей станции Vitrea 4.2. Для определения длины кавернозного тела с использованием соответствующего инструмента рабочей станции в режиме maximum intensity projection (MIP) в сагиттальной плоскости проводили линию от конца ножки кавернозного тела по его оси до головки полового члена. При аналогичных условиях определяли диаметр кавернозного тела (рис. 2). Возможности рабочей станции позволяют точно вычислить длину кавернозного тела даже при отклонении полового члена от срединной плоскости.

Результаты

Всем 26 пациентам подбор размера протезов был осуществлен на основе результатов кавернозографии. У 15 пациентов данные размеров по результатам кавернозографии совпали с истинными без погрешностей, у 11 погрешность составляла 0,5 см (которое компенсировалось насадками из комплекта). 18 пациентам установлены полуригидные протезы, 8 пациентам гидравлические трехкомпонентные протезы. За время наблюдения осложнений после установки протезов, связанных с неправильным подбором размера, зафиксировано не было.

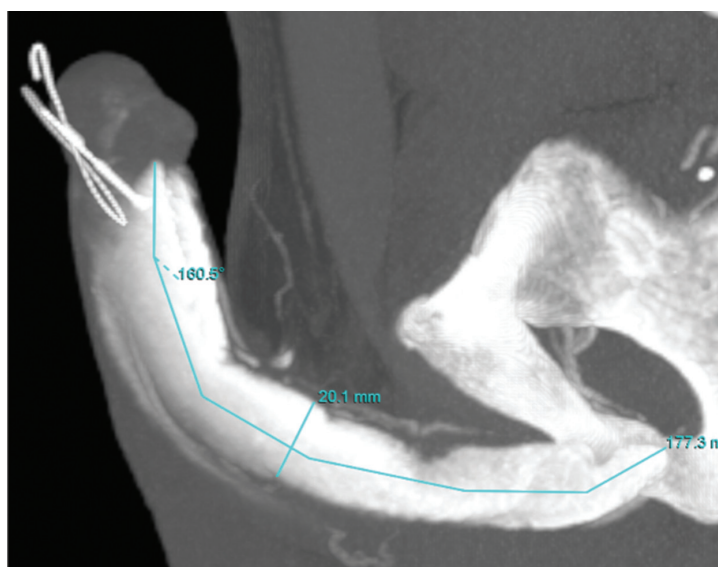
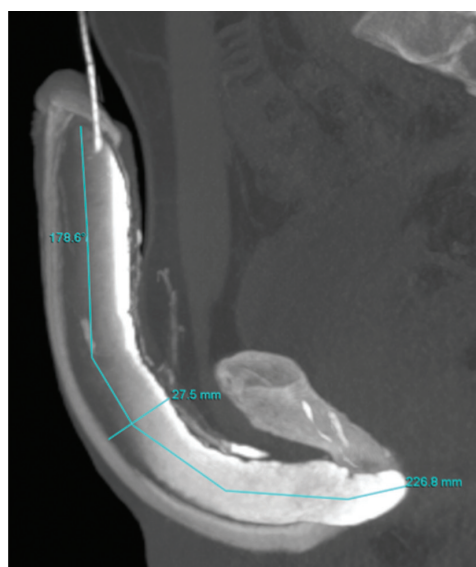


Рис. 2. Компьютерные томограммы (режим MIP), продемонстрированы измерения длины и диаметра кавернозного тела
Fig. 2. Computed tomography, MIP mode, demonstrates the measurement of the length and diameter of the corpora cavernosa

Заключение

Компьютерно-томографическая динамическая кавернозография является эффективным способом предоперационного планирования пациентов с целью уточнения размеров кавернозных тел и подбора нужного размера протеза. Данный метод позволяет с

погрешностью не более до 0,5 см подобрать имплантат, что в свою очередь приведет к снижению рисков осложнений связанных с неправильным подбором протезов, а также улучшит экономическую составляющую за счет снижения количества случаев, когда протез вскрывался с неправильно подобранного размера.

Medical Radiology and Radiation Safety. 2020. Vol. 65. No. 5. P. 42–44

Diagnostic Radiology

Computed Tomographic Cavernosography Is a Method of Preoperative Preparation of Patients for Penile Implant

P.S. Kyzlasov¹, A.T. Mustafaev¹, A.N. Bashkov¹, Y.D. Udalov¹, T.M. Topuzov², A.G. Martov¹

¹ Medical and Biological University of Innovation and Continuing Education of A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² City Center for Endoscopic Urology and New Technologies of St. Luke Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

E-mail: dr.mustafayevat@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the possibilities of CT cavernosography in the preoperative preparation of patients, in order to determine the size of cavernous bodies, for the correct selection of the size of falloprostheses.

Material and methods: 26 patients who underwent endofalloprosthetics with preoperative preparation in the form of CT cavernosography, in order to determine the size of cavernous bodies.

Results: In 15 patients, the data on the sizes of cavernosography coincided with the true ones without errors, in 11 patients the error was 0.5 cm (which was compensated by the nozzles from the kit). During the observation of complications after the installation of prostheses associated with improper selection of size was not fixed.

Conclusion: CT cavernosography is an effective way of preoperative planning of patients with the aim of clarifying the size of cavernous bodies and selecting the right size of the prosthesis. This method allows you to select an implant with an accuracy of 0.5 cm, which in turn will reduce the risk of complications associated with improper selection of prostheses, as well as improve the economic component in the form of reducing the number of cases when the prosthesis was opened with an incorrectly selected size.

Key words: *erectile dysfunction, phalloendoprosthetics, computerized dynamic cavernosography*

For citation: Kyzlasov PS, Mustafaev AT, Bashkov AN, Udalov YD, Topuzov TM, Martov AG. Computed Tomographic Cavernosography Is a Method of Preoperative Preparation of Patients for Penile Implant. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):42-4 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-42-44

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Клинические рекомендации Российского общества урологов «Эректильная дисфункция» 2019 г. С. 9-10. [Clinical guidelines of the Russian Society of Urology «Erectile dysfunction» 2019: 9-10. (In Russ.).]
2. Верткин АЛ, Пушкарь ДЮ, Долаберидзе ДЗ, Полупанова ЮС. Современные представления об эректильной дисфункции и новые методы ее лечения. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2005;4(3, ч.II):101-12. [Vertkin AL, Pushkar DY, Dolaberidze DZ, Polupanova YS. Modern ideas about erectile dysfunction and new methods of its treatment. Cardiovascular therapy and prevention. 2005;4 (3, pII): 101-12. (In Russ.).]
3. Грегуар А, Прайор Д. Импотенция. Интегрированный подход к клинической практике. М.: Медицина, 2000. 236 с. [Gregoire A, Prior D. Impotence. An integrated approach to clinical practice. Moscow. 2000. 236 p.]
4. Кызласов ПС, Мартов АГ, Кажера АА, Асфандияров ФР. История и развитие фаллопротезирования. Астраханский медицинский журнал. 2016;4:18-23 [Kyzlasov PS, Martov AG, Kazhera AA, Asfandiyarov FR. The history and development of the penile implant. Astrakhan Medical Journal. 2016;4:18-23 (In Russ.).]
5. Beheri GE. Beheri's operation for treatment of impotence-observations on 125 cases. Kasr El Aini. J. Surg. 1960(1):390.
6. Удалов ЮД, Кызласов ПС, Мартов АГ, Забелин МВ, Кажера АА. Предоперационное обследование и послеоперационное ведение пациентов с фаллоэндопротезированием. Вестник российской военно-медицинской академии. 2018;(61):222-4. [Udalov YD, Kyzlasov PS, Martov AG, Zabelin MV, Kazhera AA. Preoperative examination and postoperative management of patients with phalloendoprosthetics. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2018;(61):222-4. (In Russ.).]
7. Бурдин КА, Кызласов ПС, Мартов АГ, Удалов ЮД, Помешкин ЕВ, Забелин МВ. Эректильная дисфункция при рассеянном склерозе. Медицина в Кузбассе. 2017;16(3):17-22. [Burdin KA, Kyzlasov PS, Martov AG, Udalov YD, et al. Erectile dysfunction in multiple sclerosis. Medicine in Kuzbass. 2017;16(3):17-22. (In Russ.).]
8. Кызласов ПС, Касымов БГ, Аль-Шукри СХ, и др. Лучевая диагностика артериовенозной эректильной дисфункции: история и развитие. Урологические ведомости. 2018;8(1):40-6. [Kyzlasov PS, Kasymov BG, Al-Shukri SKh, et al. Radiation diagnosis of arteriovenous erectile dysfunction: history and development. Urological Bulletin. (In Russ.). DOI: 10.17816/uroved8140-46.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 01.07.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 01.07.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Kyzlasov P.S. <https://orcid.org/0000-0003-1050-6198>.

Mustafayev A.T. <https://orcid.org/0000-0002-2422-7942>.

Bashkov A.N. <https://orcid.org/0000-0002-4560-6415>.

Udalov Yu.D. <https://orcid.org/0000-0002-8674-2069>.

Topuzov T.M. <https://orcid.org/0000-0002-5040-5466>.

Martov A.G. <https://orcid.org/0000-0001-6324-6110>.

Е.А. Праскурничий¹, Е.А. Ионова¹, И.И. Бегунова¹, А.Н. Князев²**ВОЗМОЖНОСТИ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ В ДИАГНОСТИКЕ
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МАГИСТРАЛЬНЫХ СОСУДОВ
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА И ДРУГИХ НАРУШЕНИЯХ
УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА**¹Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва²Клинико-диагностический центр высоких медицинских технологий ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Бегунова Ирина Игоревна, irinasgma@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучение структурно-морфологических особенностей атеросклеротического поражения крупных магистральных сосудов (сонные артерии) при сахарном диабете 2-го типа и других нарушениях углеводного обмена.

Материал и методы: В исследование было включено 78 пациентов. Критерии исключения: возраст моложе 40 лет, беременность, острые инфекционные заболевания, а также хронические заболевания в сроки менее 2 нед с момента наступления полной клинической и лабораторной ремиссии, выраженная сердечная (фракция выброса левого желудочка менее 30%) и почечная (содержание креатинина в крови более 300 мкмоль/л) недостаточность, злоупотребление алкоголем или наркотическая зависимость.

В группе обследованных мужчин было 44 человека (56,4%), женщин — 34 человека (43,6%). Ишемическая болезнь сердца была выявлена у 54 (69,2%) лиц, у 24 (30,8%) обследуемых лиц признаков ишемической болезни сердца не зарегистрировано; 19 (24,4%) человек имели в анамнезе инсульт, 18 (23%) человек — инфаркт миокарда. У 42 человек (53,8%) выявлена дисциркуляторная энцефалопатия различной степени, у 34 (43,6%) человек — гипертоническая болезнь, нарушения углеводного обмена — 42 пациента, 12 (15,3%) больных — сахарный диабет 2-го типа, 30 (38,4%) пациентов — метаболический синдром.

Были сформированы три группы обследованных. В группу лиц без метаболического синдрома было включено 48 человек (61,5% от общего количества обследованных). В группу лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа было включено 18 лиц (23,1%). В группу лиц с сахарным диабетом 2-го типа было включено 12 лиц (15,4%).

Обследование пациентов включало: физикальный осмотр; лабораторную диагностику; электрокардиографию; трансторакальную эхокардиографию; многосрезовую компьютерную томографию с ангиоконтрастированием.

Результаты: У 78 пациентов были выявлены различные по плотности атеросклеротические бляшки. Среди групп обследованных лиц различий по объему не получено. У больных сахарным диабетом 2-го типа наблюдается уменьшение липидно-фиброзной составляющей и нарастание плотности атеросклеротической бляшки.

Заключение: Многосрезовая компьютерная томография позволяет выявлять различные формы сосудистого поражения, прогрессирование процесса, оценивать выраженность структурно-морфологических проявлений атеросклероза при сахарном диабете 2-го типа и метаболическом синдроме, открывая широкие возможности диагностики ранних стадий атеросклеротического поражения сосудов при данной патологии.

Ключевые слова: компьютерная томография, атеросклероз, атеросклеротическая бляшка, сахарный диабет, метаболический синдром

Для цитирования: Праскурничий Е.А., Ионова Е.А., Бегунова И.И., Князев А.Н. Возможности компьютерной томографии в диагностике атеросклеротического поражения магистральных сосудов при сахарном диабете второго типа и других нарушениях углеводного обмена. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5): 45-50.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-45-50

Введение

В настоящее время ключевая роль в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса отводится сахарному диабету и другим вариантам нарушений углеводного обмена [1–3]. Как известно, атеросклероз представляет собой генерализованный процесс, способный поражать любой сосуд; однако некоторые сосуды поражаются чаще (например, коронарные сосуды и сосуды головного мозга), тогда как другие — реже (например, внутренняя грудная артерия, несмотря на близость к коронарным артериям и по расположению и по строению) [4]. Как и любое хроническое заболевание, атеросклероз течет волнообразно, с периодами относительной стабильности (покоя) и периодами быстрого прогрессирования. Заболевание после длительного бессимптомного течения проявляется хроническими (стабильная стенокардия, перемежающаяся хромота) или острыми (инсульт, инфаркт миокарда) клиническими ситуациями. В то же время, иногда распространенный атеросклероз не

имеет манифестных клинических проявлений и выявляется только на аутопсии [4].

В патоморфологическом отношении атеросклероз представляет собой совокупность изменений в интиме артерий, развивающихся под влиянием компонентов крови и гемодинамических воздействий на структурные и метаболические свойства артериальной стенки, и состоящей из локального накопления липидов, других компонентов крови и элементов фиброзной ткани. При этом поражение интимы сопровождается изменениями в средней оболочке артериальной стенки. В интиме атерогенные липопротеиды, связанные с протеогликаном, могут вступать в химические реакции, в процессе которых происходит их модификация. Основную роль при этом играют две реакции: окисление и неферментативное гликозилирование. В интиме, в отличие от плазмы, содержание антиоксидантов скудное, поэтому липопротеиды здесь в большей мере подвержены окислению [5].

При сахарном диабете стойкая гипергликемия способствует ускорению неферментативного гликозилирования апопротеидов и собственных белков ин-

тимы, что вызывает нарушение их функции. Показано, что окисленные и гликозилированные липопротеиды и их компоненты участвуют во многих процессах атеросклеротического повреждения [6], что объясняет высокие темпы прогрессирования атеросклеротического процесса при сахарном диабете и других вариантах нарушения углеводного обмена. В этой связи крайне важным представляется понимание практикующими врачами возможности раннего развития и быстрого прогрессирования атеросклероза у данной категории больных и необходимости использования в клинической практике доступных методов мониторинга атеросклеротического процесса.

Целью настоящего исследования послужило изучение структурно-морфологических особенностей атеросклеротического поражения крупных магистральных сосудов (на примере сонных артерий) при сахарном диабете 2-го типа и других вариантах нарушений углеводного обмена методом многосрезовой рентгеновской компьютерной томографии.

Материал и методы

В исследование было включено 78 пациентов из числа лиц, обратившихся за медицинской помощью, добровольно изъявивших желание участвовать в данном исследовании, отобранных посредством случайной выборки. Критериями исключения послужили возраст моложе 40 лет, беременность, острые инфекционные заболевания, а также хронические заболевания в сроки менее 2 нед с момента наступления полной клинической и лабораторной ремиссии, выраженная сердечная (фракция выброса левого желудочка менее 30%) и почечная (содержание креатинина в крови более 300 мкмоль/л) недостаточность, злоупотребление алкоголем или наркотическая зависимость.

Медикаментозная терапия назначалась в соответствии с показаниями и включала: бета-адреноблокаторы, антагонисты кальция, нитраты короткого и пролонгированного действия, препараты ацетилсалициловой кислоты, сердечные гликозиды, диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, сахароснижающие и седативные препараты. При этом важно отметить, что включенные в исследование пациенты не принимали или не имели в анамнезе указаний на прием липидоснижающих препаратов, в частности статинов.

В группе обследованных мужчин было 44 человека (56,4%), женщин — 34 человека (43,6%); при этом средний возраст группы составил $62,0 \pm 1,2$ года. Ишемическая болезнь сердца, диагностированная на основании клинического и инструментальных (включая в ряде случаев коронароангиографию) методов обследования, была выявлена у 54 (69,2%) лиц, у 24 (30,8%) обследуемых лиц признаков ишемической болезни сердца не зарегистрировано. 19 (24,4%) человек имели в анамнезе инсульт, а 18 (23%) человек — инфаркт миокарда. У 42 человек (53,8%) выявлена дисциркуляторная энцефалопатия различной степени. У 34 (43,6%) человек выявлена гипертоническая болезнь.

Проявления нарушений углеводного обмена диагностированы у 42 пациентов. У 12 (15,3%) больных диагностирован сахарный диабет 2-го типа. У 30 (38,4%)

пациентов, включенных в исследование, согласно критериям ВНОК (Всероссийское научное общество кардиологов) верифицирован метаболический синдром.

В соответствии с задачами исследования были сформированы три группы обследованных. В группу лиц без метаболического синдрома было включено 48 человек, что составило 61,5% от общего количества обследованных. Средний возраст в данной выделенной группе обследуемых составил $62,6 \pm 1,5$ года, мужчин было несколько меньше — 22 человека (45,8%), чем женщин — 26 человек (54,2%). 9 (18,7%) человек имели в анамнезе инсульт и 11 (22,9%) — инфаркт миокарда. При объективном обследовании среднее значение индекса массы тела составило $27,7 \pm 4,8$ кг/м². У 24 (50%) человек выявлена дисциркуляторная энцефалопатия различной степени, у 32 (66,7%) — ишемическая болезнь сердца, у 20 (41,6%) — гипертоническая болезнь.

В группу лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа было включено 18 лиц, что составило 23,1% от общего количества обследованных. Средний возраст в данной выделенной группе обследуемых составил $60,8 \pm 2,0$ года, мужчин было больше — 14 человек (77,8%), чем женщин — 4 (22,2%). 7 (38,9%) человек имели в анамнезе инсульт и 4 (22,1%) — инфаркт миокарда. При объективном обследовании диагностированы признаки абдоминальной формы ожирения: среднее значение индекса массы тела составило $32,9 \pm 1,2$ кг/м². У 10 (56,5%) человек выявлена дисциркуляторная энцефалопатия различной степени, у 13 (72,2%) — ишемическая болезнь сердца, у 8 (44,4%) — гипертоническая болезнь.

В группу лиц с сахарным диабетом 2-го типа было включено 12 лиц, что составило 15,4% от общего количества обследованных. Средний возраст в данной выделенной группе обследуемых составил $61,3 \pm 3,9$ года, мужчин было несколько больше — 7 человек (58,3%), чем женщин — 5 человек (41,7%). 3 (25%) человека имели в анамнезе инсульт и 2 (16,7%) — инфаркт миокарда. При объективном обследовании диагностированы признаки абдоминальной формы ожирения: среднее значение индекса массы тела составило $33,4 \pm 1,5$ кг/м². У 8 (66,7%) человек выявлена дисциркуляторная энцефалопатия различной степени, у 9 человек (75%) — ишемическая болезнь сердца, у 6 человек (50%) — гипертоническая болезнь.

При сравнении по возрасту, частоте развития в анамнезе инсульта и инфаркта миокарда выделенные нами группы (группа лиц без метаболического синдрома, группа лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа и группа лиц с метаболическим синдромом с сахарным диабетом 2-го типа) мало отличаются друг от друга и различие недостоверно. В группе лиц без метаболического синдрома по сравнению с группой лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа и с сахарным диабетом 2-го типа достоверно ниже индекс массы тела. При сравнении групп по частоте встречаемости ишемической болезни сердца, дисциркуляторной энцефалопатии, гипертонической болезни достоверных различий не выявлено.

Обследование пациентов включало: клиническую оценку состояния больного со сбором жалоб, анам-

неза и физикального осмотра; общий клинический анализ крови; общий клинический анализ мочи; биохимический анализ крови с определением глюкозы плазмы крови натощак, креатинина, общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности, холестерина липопротеидов высокой плотности и триглицеридов; электрокардиографию с регистрацией в 12 стандартных отведениях; трансторакальную эхокардиографию; многосрезовую компьютерную томографию (КТ) с ангиоконтрастированием.

В данном исследовании в качестве наиболее доступной и изученной модели крупных магистральных артерий для изучения атеросклеротического поражения были выбраны сонные артерии. КТ проводилась с ангиоконтрастированием всем пациентам на компьютерном томографе Somatom Emotion 6 (Siemens, ФРГ). При этом использовалась следующая методика исследования: КТ головного мозга и шеи по программе объемного сканирования с толщиной среза 1,0 мм, полем обзора от 100 × 100 мм до 200 × 200 мм, матрицей от 512 × 512 элементов до 1024 × 1024 мм, размером пиксела от 0,1 × 0,1 мм до 0,39 × 0,39 мм, коллимацией пучка 1 мм и питчем 1. Лучевая нагрузка составляла 2,0 мЗв. Перед исследованием всем пациентам устанавливался кубитальный катетер на одной из верхних конечностей с целью внутривенного введения контрастного вещества во время исследования. Контрастное усиление проводилось при помощи внутривенного введения 100 мл Omnipaque 300. У всех обследованных пациентов реакции на внутривенное введение Omnipaque 300 не было. Обработка данных при составлении заключения производилось при помощи следующих компьютерных программ: eFilm Workstation версии 2.1 компании Merge Healthcare; DicomWorks версии 1.3.5; ImageJ версии 1.37.

При обработке данных выявлялось наличие атеросклеротического поражения, рассчитывались следующие параметры атеросклеротической бляшки при её наличии: средняя плотность; размеры; протяженность; процентное содержание липидно-фиброзного и кальцифицированного компонентов.

С учетом того, что при выделении участка среза, принадлежащего тому или иному компоненту атеросклеротической бляшки, участвует человеческий фактор, для большей достоверности получаемых данных подобные расчеты были проделаны тремя разными специалистами для каждого выделенного кальцифицированного или липидно-фиброзного участка атеросклеротической бляшки. И в дальнейшем при расче-

тах использовался среднеарифметический показатель из трех полученных данных для каждой бляшки.

Определение степени стеноза сосуда производилось при помощи фирменного программного обеспечения, установленного на рабочем месте оператора компьютерного томографа. Статистический анализ полученных результатов проводился при помощи пакета программ Microsoft Excel 2000 и BIOSTAT for Windows с использованием рекомендованных критериев. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Учитывались и анализировались следующие основные параметры: среднее арифметическое значение (M), погрешность среднего арифметического (m) и среднее квадратичное отклонение (σ). Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где не указана другая форма представления данных. Достоверность различий параметров количественных переменных определялась по t -критерию Стьюдента. Достоверность различий качественных признаков в группах определялась при помощи критерия χ^2 . Для оценки связи количественных признаков использовались методы линейной регрессии и корреляции (коэффициент корреляции Пирсона).

Результаты исследования

При обследовании 78 пациентов были выявлены различные по плотности атеросклеротические бляшки. Для каждой выявленной методом КТ с ангиоконтрастированием атеросклеротической бляшки был произведен расчет объема бляшки, средней плотности бляшки, процентного содержания липидно-фиброзно-тканевого и кальцифицированного компонентов.

В табл. 1 показано, что в группе лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа средняя плотность атеросклеротической бляшки, выявленной в бассейне сонных артерий, составила $142,0 \pm 16,5$ ед. Хаунсфилда. Средний процент содержания липидно-фиброзно-тканевого компонента достигал значений $48,6 \pm 4,1\%$, а средний процент содержания кальцифицированного компонента — $15,8 \pm 2,9\%$. Объем атеросклеротической бляшки был $251,1 \pm 42,6$ мм³.

В группе лиц с сахарным диабетом 2-го типа средняя плотность атеросклеротической бляшки, выявленной в бассейне сонных артерий, достигала значений $260,6 \pm 29,6$ ед. Хаунсфилда. Средний процент содержания липидно-фиброзно-тканевого компонента составил $28,9 \pm 5,3\%$, а средний процент содержания кальцифицированного компонента — $33,5 \pm 4,2\%$. Объем атеросклеротической бляшки равнялся $310,5 \pm 64,0$ мм³.

Таблица 1

Морфологические особенности атеросклеротической бляшки у выделенных групп лиц Morphological features of atherosclerotic plaque in selected groups of individuals

Параметры атеросклеротической бляшки	Лица без МС	Лица с МС без СД 2-го типа	Лица с СД 2-го типа
Объем, мм ³	258,4 ± 36,9	251,1 ± 42,6	310,5 ± 64,0
Средняя плотность, ед. Хаунсфилда	194,1 ± 19,0	142,0 ± 16,5	260,6 ± 29,6*
Содержание липидно-фиброзно-тканевого компонента, %	40,7 ± 3,4	48,6 ± 4,1	28,9 ± 5,3*
Содержание кальцифицированного компонента, %	22,1 ± 2,9	15,8 ± 2,9	33,5 ± 4,2*

Примечание: МС — метаболический синдром; СД — сахарный диабет; * — различия достоверны с группой лиц без сахарного диабета при $p < 0,05$

В группе лиц без метаболического синдрома средняя плотность атеросклеротической бляшки, выявленной в бассейне сонных артерий составила $194,1 \pm 19,0$ ед. Хаунсфилда. Средний процент содержания липидно-фиброзно-тканевого компонента равнялся $40,7 \pm 3,4\%$, а процент содержания кальцифицированного компонента был в среднем $22,1 \pm 2,9\%$. Объем атеросклеротической бляшки у лиц данной группы составил $258,4 \pm 36,9$ мм³.

При сравнительном анализе каждого из перечисленных параметров в трех группах пациентов были получены следующие результаты. Различия в объеме атеросклеротической бляшки между всеми группами лиц (лица без метаболического синдрома, лица с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа, лица с сахарным диабетом 2-го типа) носят незначительный характер (рис. 1). Следовательно, выделенные группы обследованных лиц были сопоставимы по объему атеросклеротических бляшек.

На рис. 2 представлены результаты сравнительной оценки процентного содержания липидно-фиброзного компонента в различных группах обследованных лиц. Обращает внимание достоверное различие в процентном содержании липидно-фиброзного компонента атеросклеротических бляшек лишь между группой лиц с метаболическим синдромом и группой больных сахарным диабетом 2-го типа. Различия между группой лиц без метаболического синдрома и группой лиц с сахарным диабетом 2-го типа носит характер тенденции, в то время как различия между группой лиц без метаболического синдрома и группой лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа незначительны. Приведенные данные в целом указывают на меньшее содержание липидно-фиброзной составляющей в атеросклеротической бляшке у больных сахарным диабетом 2-го типа.

По данным сравнительной оценки процентного содержания кальцифицированного компонента атеросклеротических бляшек имеется статистически достоверное различие между группой лиц без метаболического синдрома и группой больных сахарным диабетом 2-го типа (рис. 3). Кроме того, по данному показателю различается группа лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа и группа больных сахарным диабетом 2-го типа. Различия же в процентном соотношении кальцифицированного компонента между группой лиц без метаболического синдрома и группой лиц с метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа незначительны. Эти данные свидетельствуют о нарастании содержания кальцифицированной составляющей в атеросклеротической бляшке у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Очевидным следствием выявленных тенденций служит появление значимого различия средней плотности бляшек у лиц с метаболическим синдромом и больных сахарным диабетом 2-го типа. Выявлена также тенденция к достоверности различий средней плотности бляшек между лицами без метаболического синдрома и лицами с сахарным диабетом 2-го типа, а также между лицами без метаболического синдрома и лицами с метаболическим синдромом без сахарного

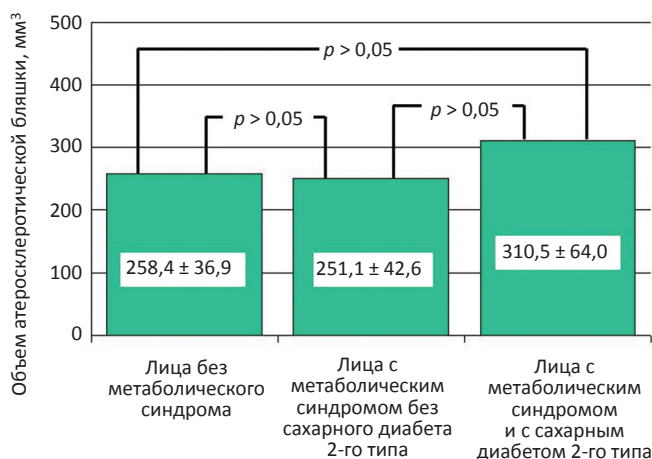


Рис. 1. Объем атеросклеротической бляшки у разных групп обследованных лиц

Fig. 1. Volume of atherosclerotic plaque in different groups of examined individuals

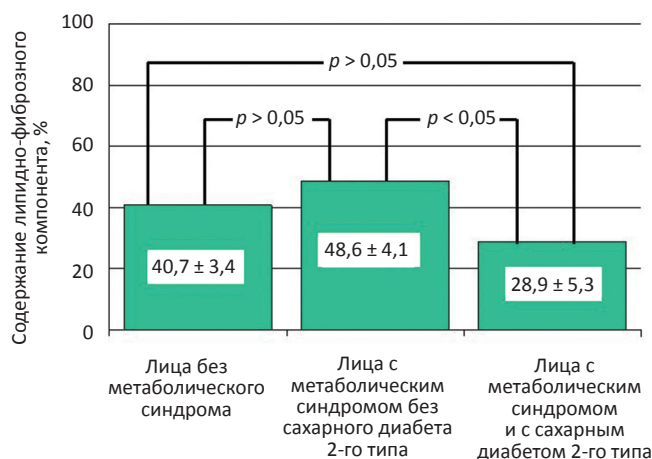


Рис. 2. Процентное содержание липидно-фиброзного компонента атеросклеротических бляшек у разных групп обследованных лиц

Fig. 2. Percentage of the lipid-fibrous component of atherosclerotic plaques in different groups of examined individuals

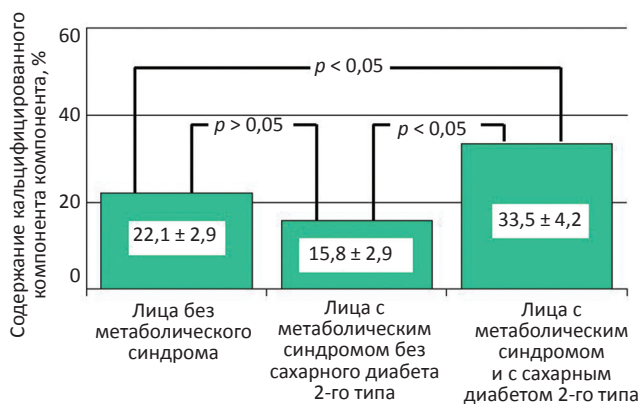


Рис. 3. Процентное содержание кальцифицированного компонента атеросклеротических бляшек у разных групп обследованных лиц

Fig. 3. Percentage of calcified component of atherosclerotic plaques in different groups of examined individuals

диабета 2-го типа. Приведенные данные указывают на нарастание плотности атеросклеротических бляшек у больных сахарным диабетом 2-го типа, что связано с процессом их кальцификации.

Обращает также внимание, что при анализе зависимости средней плотности атеросклеротической бляшки от её отдельных структурно-морфологических параметров были получены достоверные корреляционные связи. Сильная достоверная ($p < 0,001$), прямая взаимосвязь показателя средней плотности бляшки и процента кальцифицированного компонента прослеживается в группе лиц без метаболического синдрома ($r = 0,95$), в группе лиц метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа ($r = 0,91$) и в группе больных сахарным диабетом 2-го типа ($r = 0,94$). Наряду с этим имеется сильная достоверная обратная зависимость средней плотности бляшки и процента липидно-фиброзно-тканевого компонента в группе лиц без метаболического синдрома ($r = -0,77$), в группе лиц метаболическим синдромом без сахарного диабета 2-го типа ($r = -0,84$) и в группе больных сахарным диабетом 2-го типа ($r = -0,84$).

Представленные данные указывают на решающее значение процесса кальцификации в повышении плотности атеросклеротической бляшки и в снижении процента содержания липидно-фиброзно-тканевого компонента в бляшке при анализе данного параметра во всех группах обследованных.

При анализе вклада особенностей клинико-лабораторного статуса в формирование структурно-морфологических особенностей атеросклеротической бляшки при разных вариантах нарушений углеводного обмена были получены следующие результаты. Корреляционная зависимость процентного содержания липидно-фиброзно-тканевого компонента от уровня триглицеридов крови у группы лиц без метаболического синдрома носила умеренный ($r = 0,42$) и достоверный ($p < 0,05$) характер. В группе лиц с метаболическим синдромом процентное содержание липидно-фиброзно-тканевого компонента от уровня триглицеридов также носит умеренную ($r = 0,47$) и достоверную ($p < 0,05$) корреляционную зависимость. Это показывает, что независимо от наличия или отсутствия метаболического синдрома, процентное содержание липидно-фиброзно-тканевого компонента имеет умеренную достоверную взаимозависимость от уровня триглицеридов крови.

Корреляционная зависимость процентного содержания кальцифицированного компонента от уровня среднего гемодинамического артериального давления носит в группе лиц с метаболическим синдромом умеренный ($r = 0,52$) и достоверный характер. Это косвенно подтверждается данными достоверной корреляции средней плотности бляшки и уровня среднего гемодинамического артериального давления в группе лиц с метаболическим синдромом ($r = 0,53$; $p < 0,05$). Представленные данные указывают на зависимость ряда процессов атерогенеза при метаболическом син-

дроме, в частности кальцификации атеросклеротической бляшки, от уровня артериального давления.

Кроме того, в группе лиц с метаболическим синдромом выявлена достоверная, положительная, умеренная ($r = 0,53$) корреляция средней плотности бляшки и уровня глюкозы крови натощак, указывающая на роль уровня гликемии в потенцировании атерогенеза при метаболическом синдроме.

Обсуждение

Представленные результаты исследования в целом свидетельствуют, что характер атеросклеротического поражения сонных артерий и соотношение различных типов атеросклеротических бляшек при метаболическом синдроме существенно не отличаются от таковых у лиц, не имеющих клинико-лабораторных признаков углеводных нарушений. В то же время, с учетом приведенных данных по процентному содержанию липидно-фиброзного и кальцифицированного компонентов и средней плотности бляшки у лиц различных групп показано, что нарастание нарушений углеводного обмена с развитием сахарного диабета 2-го типа сопровождается достоверным значимым прогрессированием атеросклеротического поражения. Это выражается в виде увеличения степени кальцификации атеросклеротических бляшек, что проявлялось не только в увеличении процентного содержания кальцифицированного компонента, но и в росте средней плотности атеросклеротической бляшки. При сопоставимых объемах атеросклеротических бляшек при сахарном диабете 2-го типа они отличались большей плотностью, имели выраженный кальцифицированный компонент, тогда как при метаболическом синдроме без сахарного диабета 2-го типа в их составе преобладал липидно-фиброзный компонент.

Изучение корреляционных взаимоотношений позволило продемонстрировать зависимость липидно-фиброзного компонента бляшки от выраженности гипертриглицеридемии, а также средней плотности бляшки от уровней среднего гемодинамического артериального давления и гликемии при метаболическом синдроме, что отражает патогенетическое значение его отдельных компонентов в атерогенезе.

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали определенные возможности многосрезового компьютерно-томографического исследования в изучении структурно-морфологических особенностей атеросклеротического поражения крупных сосудов при сахарном диабете 2-го типа и метаболическом синдроме. Данный метод позволяет выявлять различные формы сосудистого поражения, прогрессирование процесса, оценивать выраженность структурно-морфологических проявлений атеросклероза при рассмотренных вариантах нарушения углеводного обмена, открывая широкие возможности диагностики ранних стадий атеросклеротического поражения сосудов при данной патологии.

Possibilities of Multislice Computed Tomography in the Diagnosis of Atherosclerotic Lesions of the Main Vessels for Type 2 Diabetes and Other Variants Disorders of Carbohydrate Metabolism

E.A. Praskurnichiy¹, E.A. Ionova¹, I.I. Begunova¹, A.N. Knyazev²

E-mail: irinasgma@yandex.ru

ABSTRACT

Purpose: Study of structural and morphological features of atherosclerotic lesions of large main vessels (carotid arteries) in type 2 diabetes mellitus.

Material and methods: The study included 78 patients. Exclusion criteria: age under 40 years, pregnancy, acute infectious diseases, as well as chronic diseases within less than 2 weeks from the onset of complete clinical and laboratory remission, severe cardiac (LVEF < 30 %) and renal (blood creatinine > 300 mmol/l) insufficiency, alcohol abuse or drug dependence.

There were 44 men (56.4 %) and 34 women (43.6 %) in the group surveyed. Coronary heart disease was detected in 54 (69.2 %) individuals, 24 (30.8 %) of the examined individuals had no signs of coronary heart disease; 19 (24.4 %) people had a history of stroke, 18 (23 %) people — myocardial infarction. 42 people (53.8 %) had dyscirculatory encephalopathy of various degrees, 34 (43.6 %) had hypertension, 42 patients had carbohydrate metabolism disorders, 12 (15.3 %) patients had type 2 diabetes, and 30 (38.4 %) patients had metabolic syndrome.

Three groups of subjects were formed. The group of people without metabolic syndrome included 48 people (61.5 % of the total number of examined). The group of people with metabolic syndrome without type 2 diabetes included 18 individuals (23.1 % of the total number of examined). The group of people with type 2 diabetes included 12 individuals (15.4 % of the total number of examined).

The examination of patients included: physical examination; laboratory diagnostics; electrocardiography; transthoracic echocardiography; multislice computed tomography with angiography.

Results: 78 patients were found to have different density of atherosclerotic plaques. There were no differences in volume among the groups of people surveyed. In patients with type 2 diabetes, there is a decrease in the lipid-fibrous component and an increase in the density of atherosclerotic plaque.

Conclusion: Multislice computed tomography can detect various forms of vascular damage, the progression of the process, and assess the severity of structural and morphological manifestations of atherosclerosis in type 2 diabetes and metabolic syndrome at an early stage.

Key words: multislice computed tomography, atherosclerosis, atherosclerotic plaque, diabetes mellitus, metabolic syndrome

For citation: Praskurnichiy EA, Ionova EA, Begunova II, Knyazev AN. Possibilities of Multislice Computed Tomography in the Diagnosis of Atherosclerotic Lesions of the Main Vessels for Type 2 Diabetes and Other Variants Disorders of Carbohydrate Metabolism. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):45-50 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-45-50

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сатапано А, Грахам И, Баккер Г, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. Eur Heart J. 2016;37(39):2999-3058.
2. Федоров АЮ, Усов ВЮ, Трубаева ИА, Тодосийчук ВВ и др. Коронарная и сердечная недостаточность. М.: Издательство СТТ. 2005. 716 с. [Fyodorov AYU, Usov VYu, Trubacheva IA, Todosiychuk VV, et al. Coronary and Heart Failure. Moscow. 2005. 716 p. (In Russ.).]
3. Эль-Хатиб Хайтам Самир. Морфологические особенности стадий развития атеросклеротических бляшек в сонных артериях (по данным исследования операционного материала). Автореф. дисс. канд. мед. наук. Саратов. 2005. 113 с. [El-Khatib Haytham Samir. Morphological features of the stages of development of atherosclerotic plaques in the carotid arteries (according to the study of surgical material). Saratov. 2005. 113 p. (In Russ.).]
4. Thon MP, Myerscough MR, Gee MW. A Spatially Resolved and Quantitative Model of Early Atherosclerosis. Bull Math Biol. 2019 Aug 7. DOI: 10.1007/s11538-019-00646-5.
5. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Галстян ГР и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. (7-й выпуск). Сахарный диабет. 2015;18(1S):1-112. [Dedov II, Shestakov MV, Galstyan GR, et al. Algorithms for specialized medical care for patients with diabetes. Diabetes. 2015;18(1S):1-112 (In Russ.).]
6. Mita T, Katakami N, Okada Y, et al. Protocol of a Prospective Observational Study on the Relationship Between Glucose Fluctuation and Cardiovascular Events in Patients with Type 2 Diabetes. Diabetes Ther. 2019 Jul 23. DOI: 10.1007/s13300-019-0665-8.
7. Seo MH, Rhee EJ, Park SE, et al. Metabolic syndrome criteria as predictors of subclinical atherosclerosis based on the coronary calcium score. Korean J Intern Med. 2015 Jan;30(1):73-81. DOI: 10.3904/kjim.2015.30.1.73.
8. Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. Curr Vasc Pharmacol. 2008;6:52-60.
9. Morita SY. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. Biol Pharm Bull. 2016;39(1):1-24.
10. Tota-Maharaj R, Blaha MJ, Blankstein R, et al. Association of coronary artery calcium and coronary heart disease events in young and elderly participants in the multi-ethnic study of atherosclerosis: a secondary analysis of a prospective, population-based cohort. Mayo Clin Proc. 2014 Oct;89(10):1350-9. DOI: 10.1016/j.mayocp.2014.05.017.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 22.07.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 22.07.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Praskurnichiy E.A. <https://orcid.org/0000-0002-9523-5966>.

Ionova E.A. <https://orcid.org/0000-0002-6084-2061>.

Begunova I.I. <https://orcid.org/0000-0002-2220-9564>.

Knyazev A.N. <https://orcid.org/0000-0002-5336-9077>.

О.Е. Клементьева³, О.П. Власова¹, Д.В. Степченков⁴, К.А. Лунёва³, К.Э. Терновская³,
В.М. Петриев^{1,2}, Е.Д. Степченкова¹, А.А. Кузнецов⁴, С.А. Артамонов, К.А. Мурашин⁴, П.В. Шегай¹,
С.А. Иванов¹, А.Д. Каприн¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТА С ⁹⁰Y ДЛЯ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ РАДИОЭМБОЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПЕЧЕНИ

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

³ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

⁴ АО ГНЦ РФ — Физико-энергетический институт, Обнинск

Контактное лицо: Власова Оксана Петровна, somina@inbox.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Проведение исследования безопасности радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) с иттрием-90 для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов при первичном и метастатическом раке печени.

Материал и методы: Разработанный в МРНЦ им. А.Ф. Цыба совместно с ФЭИ радиофармпрепарат представляет собой микросферы альбумина крови человека диаметром 25–40 мкм, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой и меченные радионуклидом ⁹⁰Y. Безопасность РФЛП изучалась в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России по следующим показателям: острая токсичность лиофилизированных реагентов, субхроническая токсичность РФЛП на двух видах животных, местно-раздражающее действие РФЛП терапевтической активности в эквивалентном пересчете на лабораторных животных, специфическая токсичность (аллергизирующее действие) лиофилизированных реагентов для приготовления РФЛП. В качестве экспериментальных животных были взяты самки и самцы мышей линий BALB/c, крыс Wistar, кроликов породы шиншилла и морских свинок-альбиносов. Все животные были получены из сертифицированных питомников лабораторных животных.

Результаты: В ходе исследований острой токсичности определена максимальная безопасная доза неактивного препарата. В пересчете на человека она превышает предполагаемую для клинического применения дозу почти в 20 раз. Исследование субхронической токсичности РФЛП не выявило каких-либо симптомов интоксикации. Выживаемость животных на протяжении всего периода наблюдения была абсолютной. У животных отмечали стандартные поведение и внешний вид. Динамика массы тела была положительной, значения температуры тела крыс и кроликов не выходили за пределы допустимых. Образцы готовой лекарственной формы РФЛП, представленные на доклинические исследования, не обладали местно-раздражающим действием. Раствор неактивных компонентов лиофилизированных реагентов для приготовления РФЛП не обладал аллергизирующим действием в дозах ЭД и ЭД10.

Заключение: По результатам доклинических исследований РФЛП следует считать безопасным для применения. Результаты доклинических исследований позволяют рекомендовать препарат для проведения клинических исследований.

Ключевые слова: радиофармпрепарат, микросферы альбумина, ⁹⁰Y, рак печени, радионуклидная эмболизация, доклинические испытания, токсичность, безопасность

Для цитирования: Клементьева О.Е., Власова О.П., Степченков Д.В., Лунёва К.А., Терновская К.Э., Петриев В.М., Степченкова Е.Д., Кузнецов А.А., Артамонов С.А., Мурашин К.А., Шегай П.В., Иванов С.А., Каприн А.Д. Результаты доклинических исследований безопасности радиофармпрепарата с Y для внутриартериальной радиоэмболизации злокачественных новообразований печени. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):51–9.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-51-59

Введение

По данным [1], в 2016 г. в России и странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) было зарегистрировано 741 369 человек с диагнозом «злокачественные новообразования» (ЗНО), из них с диагнозом первичного рака печени 11 732 человека. За десятилетний период количество впервые зарегистрированных с таким диагнозом пациентов увеличилось более чем на 30%. Кроме того, по статистике примерно у 20% всех впервые заболевших ЗНО обнаруживаются метастазы в печени, поскольку печень является одним из самых часто поражаемых метастазами органом, что связано с ее функцией в организме и соответствующим характером кровоснабжения [2, 3].

Метастатический рак печени — быстро прогрессирующее заболевание, характеризующееся, как правило, отсутствием специфических признаков и плохим прогнозом по выживаемости [3, 4].

Оптимальным способом лечения рака печени является ее трансплантация или резекция опухолевых очагов. К сожалению, в России и странах ЕАЭС на момент обнаружения опухоли можно радикально удалить не более чем у 15% пациентов. Кроме того, более чем у 60% прооперированных пациентов наблюдается рецидив в течение 3–5 лет после резекции [4, 5]. Из вышесказанного следует вывод, что терапия нерезектабельного рака печени нужна порядка 80% больным. В качестве методов лечения рака печени в России применяют в основном системную химиотерапию или химиоэмболизацию печеночной артерии [3].

Одним из альтернативных способов локального лучевого воздействия на опухоль является трансартериальная радиоэмболизация (ТАРЭ). Этот метод, основанный на совмещении эмболизации (закупорки сосудов) с прицельной радионуклидной терапией, применяется в мире с 2002 г. Процедура вы-

полняется путем введения в печеночную артерию микроразмерных частиц (микрофер), меченных различными радионуклидами: ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{188}Re и др. Для радиоэмболизации разрешены к клиническому применению стеклянные и/или полимерные микроферы (Theraspheres, MDS Nordion, Канада и SIR-spheres, Sirtex Medical, Австралия) с радионуклидом ^{90}Y . В 2010 г. радиоэмболизацию стали выполнять с использованием радиофармпрепарата ^{131}I -липидола (LipioCis) [6, 7].

Терапевтический эффект при проведении данной процедуры создается вследствие повреждения опухолевых клеток ионизирующим излучением радиоактивных микрофер. Радиоактивные микроферы проникают по капиллярам в опухоль на несколько миллиметров. Из-за высокой объемной скорости кровотока в опухоли (в 3–7 раз) по сравнению с окружающими тканями, создается направленная доставка микрофер в опухоль и формируется высокая доза облучения в опухоли при щадящем облучении тканей, окружающей опухоль [7, 8]. В отсутствии противопоказаний к процедуре выбирают поглощенную в опухоли печени дозу облучения порядка 120–150 Гр, тогда как доза на всю печень не должна превышать 60 Гр [8–10]. Метод ТАРЕ разрешен в качестве лечения ЗНО печени различного генеза во многих странах мира, в том числе России [10, 11]. Более детальная информация о методе ТАРЕ приведена в обзоре [12].

Радионуклид иттрий-90 (^{90}Y) более 30 лет используют в качестве метки в радионуклидной терапии из-за его подходящих физико-химических характеристик, поскольку он является только бета-излучателем и не имеет гамма-составляющей. Небольшой период полураспада ^{90}Y (64 ч) позволяет минимизировать лучевые повреждения в критических органах пациента. Поскольку средняя энергия бета-частиц ^{90}Y равна 0,9 МэВ, а максимальная энергия — 2,28 МэВ, излучение радионуклида способно проникать на глубину до 13 мм (в среднем 4 мм) в мягкой биологической ткани [13].

В мировой клинической практике на основе микрофер с радионуклидом ^{90}Y сформированы лечебные протоколы по ТАРЕ гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) печени, системы индивидуального дозиметрического планирования, а также успешно пролечено более 30 тыс. пациентов в странах Европы и США [10, 11]. В 2017 г. было издано руководство по радиоэмболизации, основанное на анализе различных мировых клинических практик в США и Европе с 1996 по 2017 гг. Из руководства следует, что ТАРЕ с микроферами, меченными ^{90}Y , клинически доказана и является необходимой, с медицинской точки зрения, для следующих ЗНО печени:

- метастатические и радиочувствительные ЗНО печени первичного колоректального рака,
- метастатические и радиочувствительные ЗНО печени нейроэндокринных опухолей;
- неоперабельная первичная ГИЦ [10].

В России на сегодняшний день было проведено лишь 8 операций по ТАРЕ печени: 4 операции с зарубежными стеклянными микроферами с ^{90}Y были проведены в 2009 г. в РНЦРХТ (Санкт-Петербург),

1 операция зарубежными микроферами проведена в 2011 г. в ГКБ № 55 (Москва), 2 операции выполнены зарубежными стеклянными микроферами в 2012 г. в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва) и еще одна процедура ТАРЕ с отечественными стеклянными микроферами с ^{90}Y , производства ООО «Бебиг» была проведена в мае 2019 г. в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск) [4, 5].

Целью настоящего исследования являлось изучение безопасности разработанного радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) на основе модифицированных микрофер альбумина крови человека диаметром 25–40 мкм, меченных радионуклидом ^{90}Y , на экспериментальных животных.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать специфическую токсичность (аллергизирующее действие) раствора неактивных лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата.
2. Исследовать местно-раздражающее действия готовой лекарственной формы радиофармпрепарата.
3. Исследовать острую токсичность раствора неактивных лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата.
4. Исследовать субхроническую токсичность готовой лекарственной формы радиофармпрепарата.

Материал и методы

Для проведения исследований безопасности РФЛП в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России были поставлены следующие препараты:

— опытные серии микрофер альбумина, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой («МСА-ДТПА, лиофилизат»), диаметром 25–40 мкм, которые были произведены в МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиале НМИЦ радиологии Минздрава России;

— опытные серии радиофармпрепарата «ДТПА-МСА, ^{90}Y », на основе лиофилизата МСА-ДТПА, меченного ^{90}Y , которые готовили в ФЭИ по совместно разработанной с МРНЦ им. А.Ф. Цыба опытно-промышленной технологии.

Основные характеристики РФЛП «МСА-ДТПА, ^{90}Y » представлены в табл. 1 и 2.

Изучение безопасности РФЛП проводилось с применением методик, описанных в Руководствах по проведению доклинических исследований [14, 15].

Для исследований безопасности РФЛП «ДТПА-Микроферы альбумина, 25–40 мкм, ^{90}Y » использованы:

- мыши линии BALB/c самки и самцы, средняя масса тела 18–20 г;
- крысы линии Wistar самки и самцы, средняя масса тела 150–190 г;
- кролики породы шиншилла самки и самцы, средняя масса тела 1700–2100 г;
- морские свинки альбиносы самки и самцы, средняя масса тела 220–260 г.

Животные были получены из сертифицированных питомников лабораторных животных и содержались в стандартных условиях. Все манипуляции с использованными лабораторными животными

Таблица 1

Физико-химические характеристики «МСА-ДТПА, лиофилизат»
Physical and chemical characteristics of «MSA-DTPA, lyophilisate»

Показатель	Норма
Название ЛП	Микросферы альбумина крови человека, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой, 25–40 мкм, лиофилизат
Сокращенное название ЛП	МСА-ДТПА, лиофилизат
Внешний вид	Леофилизат желтоватого цвета
Размер частиц	25–40 мкм
Стерильность	Стерильны
Пирогенность	Апирогенны
Срок годности	6 мес от даты производства
Хранение	Хранят в холодильнике в хорошо закупоренных флаконах при температуре +2 °С до +8 °С
Комплектность	Один флакон содержит 20 мг субстанции «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм» и 1 мг Твина-80; рассчитан на получение одного флакона готовой лекарственной формы (ГЛФ) РФЛП « ⁹⁰ Y-ДТПА-МСА, 25–40 мкм»

Таблица 2

Физико-химические характеристики «МСА-ДТПА-⁹⁰Y»
Physical and chemical characteristics of «MSA-DTPA-⁹⁰Y»

Показатель	Норма
Название РФЛП	Микросферы альбумина крови человека, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой, 25–40 мкм, меченные ⁹⁰ Y
Сокращенное название РФЛП	ДТПА-МСА, ⁹⁰ Y
Внешний вид	Суспензия желтоватого цвета
Размер частиц	25–40 мкм
Стерильность	Стерильны
Радиохимические примеси	Менее 5 %
Объемная активность	До 5,55 ГБк/мл (150 мКи/мл) на дату и время изготовления
Пирогенность	Апирогенны
Упаковка	Первичная упаковка: Порциями до 5,55 ГБк (до 150 мКи) на установленное время и дату поставки во флаконы из дроба для лекарственных средств вместимостью 10 мл, герметично закупоренные пробками резиновыми медицинскими и обжаты колпачками алюминиевыми. Вторичная упаковка: Флакон в защитном контейнере, паспорт и инструкцию по применению помещают в комплект упаковочный транспортный для радиоактивных веществ
Срок годности	72 ч с даты производства
Хранение	В соответствии с ОСПОРБ 99/2010 при температуре окружающей среды от + 5 °С до + 25 °С и относительной влажности воздуха 65 %
Назначение	РФЛП «ДТПА-МСА, ⁹⁰ Y» предназначен для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов с первичными и метастатическими опухолями печени

проведены в соответствии с «Руководством по лабораторным животным» [16], Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей [17] и «Правилами лабораторной практики» [18]. Процедуры, связанные с умерщвлением животных, выполняли согласно соответствующим методическим указаниям и Европейской конвенцией по их защите, изложенной в европейском руководстве по эвтаназии млекопитающих лабораторных животных и директиве Европейского сообщества (2010/63/EU) [19, 20].

Расчет вводимых доз¹ был проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное в соответствии с Руководством [14] по формуле 1:

$$ЭД = \frac{D \times 39}{K}, \quad (1)$$

где D — рекомендованная монодоза для человека; 39 — коэффициент пересчета доз для среднего человека (массой тела 70 кг); K — коэффициент пересчета доз для лабораторного животного определенной массы тела в соответствии с Руководством [14].

¹ Здесь и далее термин «доза» используется в фармакологическом, а не в радиологическом смысле.

Обоснование выбранного пути введения

Для клинического применения РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » определен единственно возможный путь введения, а именно — непосредственно в артерию печени. При проведении доклинических исследований, с целью исключения ложных результатов, вызванных возможной смертностью животных вследствие высокой травматичности процедуры внутриартериального введения, в исследованиях острой и субхронической токсичности был определен максимально приближенный к несистемному внутриартериальному введению способ — введение препарата непосредственно в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки. Выбранный путь введения для доклинических исследований полностью соответствует рекомендациям, данным в разделе 6.3 Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [14].

Исследование острой токсичности на неактивном препарате

Изучение острой токсичности лиофилизированных реагентов «МСА-ДТПА, лиофилизат» для приготовления РФЛП было проведено на двух видах животных: белые мыши линии BALB/c самки и самцы с массой тела 19–19,5 г и белые крысы линии Wistar самки и самцы с массой тела 160–169 г.

Острая токсичность неактивного препарата «МСА-ДТПА, лиофилизат» была оценена с использованием пяти последовательно увеличивающимися концентрациями неактивных компонентов лиофилизата: эквивалентной средней дозе для человека (ЭД), превышающей ЭД в пять, десять, двадцать и пятьдесят раз (ЭД5, ЭД10, ЭД20, ЭД50).

Расчет вводимых доз был проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное по формуле (1), и для мышей ЭД составила 3,64 мг/кг, а для крыс — 1,68 мг/кг. С учетом массы мышей, вводимые количества неактивного препарата для каждой мыши составили: ЭД = 0,07 мг, ЭД5 = 0,36 мг, ЭД10 = 0,73 мг, ЭД20 = 1,45 мг, ЭД50 = 3,64 мг; для каждой крысы вводимые количества препарата составили: ЭД = 0,34 мг, ЭД5 = 1,7 мг, ЭД10 = 3,4 мг, ЭД20 = 6,8 мг, ЭД50 = 17 мг.

Лабораторным животным раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» был введен однократно в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки, в количестве 0,05 мл на одну мышшь и 0,1 мл на одну крысу. Мышам и крысам контрольных групп вводили физиологический апиногенный раствор натрия хлорид 0,9% в тех же объемах.

Наблюдение за животными осуществлялось на протяжении 14 календарных дней. Критериями оценки острой токсичности являлись: выживаемость; интегральные показатели: внешний вид, реакция на внешние раздражители, болевая реакция, потребление корма и воды, количество и консистенция фекальных масс; масса тела; макроскопическая и морфометрическая оценка внутренних органов после аутопсии.

Исследование субхронической токсичности РФЛП

Для исследования отсроченного проявления нежелательного действия РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y », а также для выявления наиболее чувствительных органов и систем организма, была изучена субхроническая токсичность готовой лекарственной формы препарата терапевтической активности. Исследование было проведено на двух видах животных — крысах (линия Wistar, самки и самцы, средняя масса тела 180–200 г) и кроликах (порода Шиншилла, самки и самцы, средняя масса тела 1850–1950 г).

Методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя были сформированы 4 группы по 5 крыс в каждой и 4 группы по 3 кролика в каждой: группа № 1а — контроль/самки, группа № 1в — контроль/самцы, группа № 2а — РФЛП (ЭД)/самки, группа № 2в — РФЛП (ЭД)/самцы.

Расчет активностей вводимого РФЛП проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное по формуле (1) [14]. Предполагаемая вводимая терапевтическая активность вводимого РФЛП для клинического применения при пересчете на крысу массой 190 г составила 48,9 МБк, на кролика массой 1900 г — 248,3 МБк.

Группам контрольных животных вводили апиногенный физиологический раствор NaCl 0,9%, в объеме 0,05 мл на крысу и 0,1 мл на кролика.

Критериями оценки субхронической токсичности являлись: выживаемость; реакция на введение препарата в паренхиму печени; интегральные показатели (внешний вид и поведение); масса и температура тела; морфологический состав крови (концентрация эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, концентрация гемоглобина, значение гематокрита, лейкограмма); биохимические показатели крови (общий и прямой билирубин, АЛТ, АСТ); макроскопическая и морфометрическая оценка внутренних органов.

Выявление смертности, клинический осмотр и контрольные взвешивания проводили до введения РФЛП, на 5, 10, 20 и 30 сут после введения РФЛП. Гематологические исследования проведены на ветеринарном гематологическом анализаторе Exigo 17, производства Boule Medical A.B. (Швеция) с использованием унифицированных методик. Биохимические анализы проводили с использованием унифицированных методов на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax 4500 Plus, производства Awareness Technology (США) с использованием стандартных наборов реагентов UTS.

Продолжительность исследования субхронической токсичности РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » составила 30 сут. После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии. Вскрытие произведено сразу после гибели животных по полной патологоанатомической схеме с ведением протокола вскрытия.

Исследование местно-раздражающего действия РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y »

Исследование местно-раздражающего действия методом повторных накожных аппликаций «ДТПА-МСА, ^{90}Y » было проведено с использованием средней

предполагаемой терапевтической активности РФЛП. Поскольку предполагаемая средняя активность одной дозы вводимого пациентам РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» составляет 3000 МБк, что соответствует 42,86 МБк/кг массы пациента, пересчитанная вводимая активность на одну морскую свинку массой 150 г в ЭД составила 62,68 МБк. Пересчет активностей проводился в соответствии с Руководствами по доклиническим исследованиям [14, 15].

Методом случайной выборки с учетом массы тела животных в качестве определяющего показателя были сформированы 2 группы по 5 морских свинок: группа №1 — самки морских свинок, группа №2 — самцы морских свинок.

Объем наносимого препарата составлял 0,2 мл на животное. На боковую поверхность выстриженного участка кожи всех животных (2 × 2 см) один раз в день в течение 2 нед по 5 раз в нед наносили дозированно пипеткой по 0,2 мл РФЛП. Во избежание взаимного груминга, животных размещали в индивидуальные клетки до момента впитывания исследуемого раствора.

Реакцию на коже оценивали ежедневно по шкале оценки кожных проб [14]. Критерием проявления местнораздражающего действия считали развитие признаков неаллергического контактного дерматита.

Определение специфической токсичности

Для определения специфической токсичности исследованы алергизирующие свойства лиофилизированных реагентов (МСА-ДТПА, лиофилизат) для приготовления РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» по стандартным методикам изучения активной кожной анафилаксии и реакции общей анафилаксии на овальбумин [14] на самках и самцах морских свинок альбиносов со средней массой тела 240 ± 20 г.

Алергизирующие свойства раствора «МСА-ДТПА, лиофилизат» были оценены с использованием двух различных дозировок: в эквивалентной средней дозе для человека (ЭД) и в дозе, превышающей ЭД в десять раз (ЭД10), рассчитанных на вещество, обладающее наибольшим алергизирующим потенциалом — микросферы альбумина 25–40 мкм. С учетом того, что в монодозе РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y», предназначенного для клинического применения, содержится 20 мг модифицированных микросфер альбумина, что соответствует 0,28 мг/кг массы пациента, а масса морской свинки составляет 250 г, значение доз для каждого лабораторного животного составило: ЭД = 0,5 мг, ЭД10 = 5 мг.

Для исследования активной кожной анафилаксии (1 этап) методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, были сформированы 3 группы по 10 морских свинок в каждой (5 самок и 5 самцов): группе №1 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД; группе №2 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД10; группа №3 являлась контрольной группой, которой вводили физиологический раствор.

Животных 1 этапа групп №1 и 2 сенсibilizировали по следующей схеме: первая инъекция раствора «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10 была

произведена внутривенно, две последующие — внутримышечно через день в тех же дозах. Контрольным животным группы №3 вводили физиологический раствор в том же объеме и по той же схеме. На 17 сут (разрешающая инъекция) на выстриженных участках спины морским свинкам внутривенно вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в указанных дозах. Для контроля реактивности на другом выстриженном участке кожи группам №1 и 2 вводили по 0,05 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Контрольной группе №3 также была произведена разрешающая инъекция (ЭД). Через 20 мин всем группам животных эндокардиально вводили по 0,5 мл 1% раствора синьки Эванса. Через 30 мин животных подвергали эвтаназии и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в местах введения исследуемых растворов.

Для исследования реакции общей анафилаксии на овальбумин (2 этап) методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя также были сформированы 3 группы по 10 морских свинок в каждой (5 самок и 5 самцов): группе №1 (положительный контроль) вводили белок куриного яйца (БКЯ); группе №2 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД; группе №3 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД10.

Для получения реакции общей анафилаксии всех животных 2 этапа иммунизировали в течение трех дней путем перорального введения 1% раствора БКЯ в дозе 1 мл на 250 г массы тела. Через 12 сут после начала иммунизации БКЯ, животным групп №2 и 3 внутривенно вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10, животным группы №1 — физиологический раствор соответствующего объема. На следующие сутки процедуру повторяли. Через час животным всех групп внутрисердечно вводили 1% раствор БКЯ в дозе 1 мг на 250 г массы тела, после чего регистрировали развитие анафилактической реакции и вычисляли анафилактический индекс по Weigle [14].

Результаты и обсуждение

По результатам изучения острой токсичности у мышей и у крыс на протяжении первых 8 ч после введения исследуемых растворов, летальность отсутствовала во всех группах, кроме групп мышей и крыс с введением раствора неактивных компонентов лиофилизированных реагентов в дозе ЭД50, где среди самок и самцов зарегистрировано по одному летальному исходу в каждой подгруппе.

В течение эксперимента не была достигнута полумлетальная доза (ЛД50) как для мышей, так и для крыс, однако, согласно Руководству [13], была определена максимальная безопасная доза (МБД), при введении которой в группах животных полностью отсутствовала летальность. МБД по концентрации микросфер альбумина 25–40 мкм при введении в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки для мышей была равна 72,8 мг/кг, для крыс — 33,6 мг/кг, что в пересчете на человека превышает предполагаемую для клинического применения дозу почти в 20 раз.

Исследование клинических признаков нарушения здоровья подопытных животных не выявило гендерно детерминированных различий в чувствительности мышей и крыс к исследуемому препарату. Существенных отклонений по внешнему виду не наблюдалось ни в одной из групп животных. Также не наблюдалось существенных отклонений в потреблении воды и корма. Статистически достоверной разницы между массами внутренних органов животных контрольной и экспериментальной групп, измеренными на момент окончания эксперимента, выявлено не было.

Таким образом, изложенные выше сведения позволяют заключить, что при однократном введении растворов испытанных лиофилизированных реагентов в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки в дозах, меньших МБД, установлена хорошая переносимость препарата, отсутствие выраженных симптомов интоксикации и гибели животных.

По результатам изучения субхронической токсичности, реакция на введение исследуемого РФЛП у всех особей крыс и кроликов была нормальной. На протяжении всего исследования летальность отсутствовала во всех группах крыс и кроликов. Не было зафиксировано тяжелого состояния и признаков интоксикации. Внешний вид животных сохранялся без изменений. Каких-либо существенных отклонений в поведении (повышенной или пониженной активности) и в состоянии подопытных животных по сравнению с контрольными группами отмечено не было.

При анализе данных, характеризующих морфологический состав цельной крови, не было выявлено статистически значимых различий между контрольными и опытными группами. Известно, что основным показателем нежелательной реакции организма на воздействие инкорпорированных радионуклидов является изменение количества лейкоцитов в периферической крови. Интрапаренхимальное введение исследуемого РФЛП в эквивалентной терапевтической дозе не привело к достоверному изменению показателей числа лейкоцитов в течение всего эксперимента и на момент окончания исследования, что наглядно показано на рис. 1.

Полученные результаты биохимических показателей плазмы крови крыс и кроликов до и после

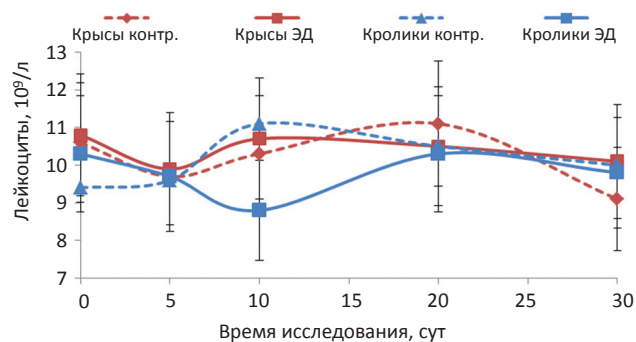


Рис. 1. Динамика изменения количества лейкоцитов
Fig. 1. Trends in the number of leukocytes

введения РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » в дозе ЭД не показали нарушений функций печени, почек и других систем органов животных, что явилось следствием отсутствия статистически достоверной разницы в изучении биохимических показателей плазмы крови между контрольными и опытными группами животных. В активности ферментов, характеризующих состояние печени — аланин- и аспартат-амино-трансфераз (АЛТ и АСТ) — не было выявлено статистически достоверных отличий. Уровень активности данных ферментов на протяжении всего эксперимента колебался в пределах нижней и верхней границ нормальных видовых значений (рис. 2, 3).

Содержание общего и прямого билирубина в крови за время исследования не изменялось во всех группах животных, что также свидетельствует о нормальной функции печени (рис. 4, 5).

Статистически значимых различий по температуре тела между животными контрольных и опытных групп не наблюдали.

У всех крыс и кроликов динамика массы тела была положительной на протяжении всего наблюдения.

Проведенный морфометрический анализ не обнаружил статистически достоверных отличий по абсолютной массе наиболее реактивных внутренних органов крыс и кроликов от аналогичных показателей у животных контрольных групп.

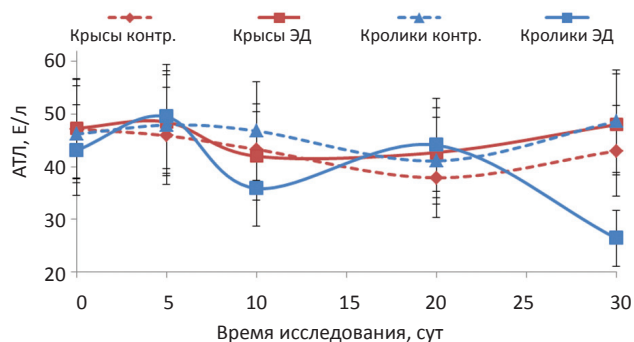


Рис. 2. Динамика изменения активности АЛТ в плазме крови
Fig. 2. Trends in ALT plasma activity

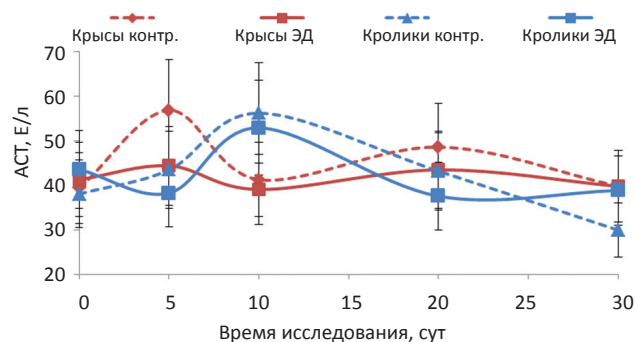


Рис. 3. Динамика изменения активности АСТ в плазме крови
Fig. 3. Trends in AST plasma activity

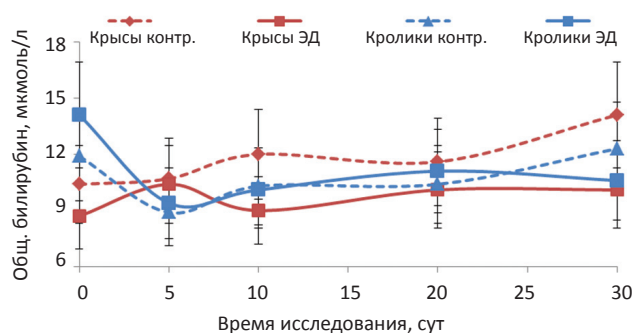


Рис. 4. Динамика изменения концентрации общего билирубина в плазме крови

Fig. 4. Trends in the concentration of total bilirubin in blood plasma

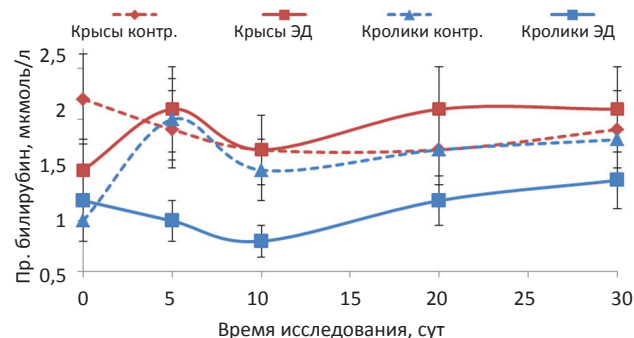


Рис. 5. Динамика изменения концентрации прямого билирубина в плазме крови

Fig. 5. Trends in the concentration of direct bilirubin in blood plasma

Таблица 3

Результаты исследования активной кожной анафилаксии контрольных и опытных групп по диаметру окрашенного пятна

Results of active dermal anaphylaxis studies in control and trial groups of dyed spots diameter

Критерий	Группа № 3 (контрольная)		Группа № 1 (ЭД)		Группа № 2 (ЭД10)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Средние значения диаметра синего пятна, мм	1,5±0,7	1,7±0,6	1,8±0,8	1,8±0,4	4,8±2,4	5,6±2,7

Анализируя данные, полученные при проведенных исследованиях субхронической токсичности РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y», можно сделать вывод о безопасности его применения.

При оценке результатов нанесения аппликационных кожных проб для определения местно-раздражающего действия РФЛП, визуальная оценка результатов многократной аппликации РФЛП показала отсутствие воспаления, эритемы и отека кожных покровов в области нанесения исследуемого препарата. Не было выявлено случаев повреждения и нарушения целостности кожных покровов на месте нанесения. Проведенное исследование показало, что образцы РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y», представленные на доклинические исследования, не обладают местно-раздражающим действием.

Средние данные результатов проведенного эксперимента по исследованию активной кожной анафилаксии по группам животных представлены в табл. 3.

В контрольной группе №3 и в группе №1 у животных размер пятен не превышал предел допустимых значений (при положительной реакции диаметр пятна не менее 6 мм). В группе №2 выявлено слабое аллергизирующее действие у некоторых животных, что можно отнести к индивидуальной непереносимости препарата, поскольку среднее значение по группе не превысило допустимых значений. Из вышесказанного следует, что исследуемая неактивная форма РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» не обладает аллергизирующими свойствами в дозе ЭД.

Исследование реакции общей анафилаксии на овальбумин показало, что значение индекса Weigle

в группе №1 (положительный контроль) составило 3,3, что можно отнести к тяжелому шоку, поскольку группу положительного контроля на протяжении всего исследования иммунизировали 1% раствором БКЯ, обладающим аллергизирующими свойствами, что привело к системной анафилактической аллергической реакции. Значение индекса Weigle в группе №2 (ЭД) составило 1,8, в группе №3 (ЭД10) составило 2,4, что близко умеренному шоку. Исследование реакции общей анафилаксии на овальбумин не привело к летальному исходу в группах животных, которым вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10 (группы №2 и 3). Также в группах №2 и 3 меньше половины животных получили тяжелый аллергический шок. Из результатов исследования следует, что явно выраженной аллергической реакции на введение растворов неактивных компонентов лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» в дозах ЭД и ЭД10 не выявлено.

Выводы

1. По результатам доклинических исследований радиофармацевтический лекарственный препарат «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» следует считать безопасным для применения.

2. Проведенные доклинические исследования безопасности радиофармацевтического лекарственного препарата позволяют рекомендовать РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰Y» для проведения клинических исследований.

Results of Preclinical Safety Tests of Radiopharmaceutical with ^{90}Y for Intra-Arterial Radioembolization of Liver Cancer

O.E. Klementyeva³, O.P. Vlasova¹, D.V. Stepchenkov⁴, K.A. Lunyova³, K.E. Ternovskaya³, V.M. Petriev^{1,2}, E.D. Stepchenkova¹, A.A. Kuznetsov⁴, S.A. Artamonov⁴, K.A. Murashin⁴, P.V. Shegai¹, S.A. Ivanov¹, A.D. Kaprin¹

¹ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

³ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

⁴ A.I. Leypunsky Institute for Physics and Power Engineering, Obninsk, Russia

E-mail: somina@inbox.ru

ABSTRACT

Purpose: Performing a safety study of a radiopharmaceutical drug with yttrium-90 for intra-arterial radioembolization of inoperable patients with primary and metastatic liver cancer.

Material and methods: The developed radiopharmaceutical is a microspheres of human blood albumin with a diameter of 25–40 microns, modified with diethylenetriaminopentaacetic acid and labeled with ^{90}Y radionuclide. The safety of the radiopharmaceutical was studied by the following indicators: acute toxicity of lyophilized reagents, subchronic toxicity of the radiopharmaceutical on two types of animals, local irritant effect of the radiopharmaceutical therapeutic activity in equivalent terms on laboratory animals, specific toxicity (allergizing effect) of lyophilized reagents for the preparation of a radiopharmaceutical drug. Female and male BALB/C mice, Wistar rats, chinchilla rabbits, and albino Guinea pigs were taken as experimental animals. All animals were obtained from certified laboratory animal nurseries.

Results: During acute toxicity studies, the maximum safe dose of an inactive drug was determined. In terms of per person, it exceeds the intended dose for clinical use by almost 20 times. The study of the subchronic toxicity of the radiopharmaceutical did not reveal any symptoms of intoxication. The survival rate of the animals during the entire observation period was absolute. Standard behavior and appearance were observed in animals. The dynamics of body weight was positive, and the body temperature of rats and rabbits did not exceed the limits allowed. Samples of the finished dosage form of the drug did not have a local irritant effect. The solution of inactive components of lyophilized reagents for the preparation of a radiopharmaceutical drug did not have an allergenic effect in quantities ten times higher than the doses administered to a person.

Conclusion: According to the results of preclinical studies, the radiopharmaceutical should be considered safe for use. The results of preclinical studies allow us to recommend the drug for clinical research.

Key words: radiopharmaceutical, albumin microspheres, ^{90}Y , liver cancer, radionuclide embolization, preclinical testing, toxicity, safety

For citation: Klementyeva OE, Vlasova OP, Stepchenkov DV, Lunyova KA, Ternovskaya KE, Petriev VM, Stepchenkova ED, Kuznetsov AA, Artamonov SA, Murashin KA, Shegai PV, Ivanov SA, Kaprin AD. Results of Preclinical Safety Tests of Radiopharmaceutical with Y for Intra-Arterial Radioembolization of Liver Cancer. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):51–59 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-51-59

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Standardized indices of oncoepidemiological situation in 2016. Eurasian Oncology Journal. 2018;6(2):80.
2. Мерабишвили ВМ, Мерабишвили ЭН, Чепик ОФ. Эпидемиология рака печени, Российский онкологический журнал. 2014(4):34–5. [Merabishvili VM, Merabishvili EN, Chepik OF. Epidemiology of liver cancer, Russian Journal of Oncology. 2014(4):34–5. (In Russ.).]
3. Подымова СД. Болезни печени: Руководство. 4-е изд, перераб. и доп. М.: «Медицина», 2005. [Podymova SD. Liver Diseases: a Guide. 4th ed. Moscow. 2005. (In Russ.).]
4. Cornelis FH, Solomon SB. Treatment of Primary Liver Tumors and Liver Metastases, Part 2: Non-Nuclear Medicine Techniques. J Nucl Med. 2018;59:1801–08, DOI: 10.2967/jnumed.116.186379.
5. Kaprin AD, Mardinskiy YS, Smirnov VP, Ivanov SA, Kostin AA, Polikhov SA, et al. The history of radiation therapy (part I). Biomedical Photonics. 2019;8(1):52–62.
6. Chai-Hong YEONG, Mu-hua CHENG, Kwan-Hoong NG. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 2014;15(10):845–63.
7. Reinders MTM, Smits MLJ, van Roekel C, Braat AJAT. Holmium-166 Microsphere Radioembolization of Hepatic Malignancies. Seminars in Nuclear Medicine. 2019;9:237–243.
8. Kafrouni M, Allimant C, Fourcade M, Vauclin S, Guiu B, Mariano-Goulart D, Bouallègue FB. Analysis of differences between $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA SPECT- and ^{90}Y -microsphere PET-based dosimetry for hepatocellular carcinoma selective internal radiation therapy. EJNMMI Research. 2019;62:1–9.
9. Braat AJAT, Kappadath SC, Ahmadzadehfard H, Stothers CL. Radioembolization with ^{90}Y Resin Microspheres of Neuroendocrine Liver Metastases: International Multicenter Study on Efficacy and Toxicity. Cardiovasc Intervent Radiol. 2019(42):413–25. DOI: 10.1007/s00270-018-2148-0.
10. Implantable Beta-Emitting Microspheres for Treatment of Malignant Tumors// United Healthcare® Oxford, Clinical Policy, Policy Number: CANCER 036.9, 2017, T2, January 1.
11. Кодина ГЕ, Красикова РН. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. М. МЭИ. 2014, 282 с. [Kodina GE, Krasikova RN. Methods for producing radiopharmaceuticals and radionuclide generators for nuclear medicine. Moscow. 2014, 282 p. (In Russ.).]
12. Бушманов АЮ, Клементьева ОЕ, Лабушкина АА, Тултаев АВ, Корсунский ВН, Кузнецова ОВ. Актуальные проблемы и перспективы применения методов ядерной медицины в диагностике и лечении гепатоцеллюлярной карциномы: аналитический обзор. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019;64(5):58–68. [Bushmanov AYU, Klementyeva OE, Labushkina AA, Tultaev AV, Korsunsky VN, Kuznetsova OV. Actual problems and prospects of using nuclear medicine methods in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: an analytical review. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(5):58–8. (In Russ.).]
13. Yang Y, Si T. Yttrium-90 transarterial radioembolization versus conventional transarterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Cancer Biol Med. 2018;15:299–310. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0177.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012, 244 с. [Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Ed. A.N. Mironova. Moscow. 2012. 244 p. (In Russ.).]

15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-изд, перераб. и доп. М.: Медицина. 2005. [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Under the general editorship of the corresponding member of RAMS. Ed by RU Khabriev. Moscow. 2005. (In Russ.)].
16. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. Москва. 2010. 344 с. [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Ed by NN Karkishchenko, SV Grachev. Moscow 2010, 344 p. (In Russ.)].
17. Извлечение из "Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" — ЕЭС, Страсбург. Ланамалогия. 1993(1):29. [Extract from the «European Convention for the protection of vertebrates used for experimental and other scientific purposes» — EEC, Strasbourg-Lanimalogia. 1993(1):29 (In Russ.)].
18. Приказ от 01 апреля 2016 г. № 199н Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации «Об утверждении правил лабораторной практики». [Order of April 01, 2016 No. 199n of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation «On Approval of Rules of Laboratory Practice». (In Russ.)].
19. The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition ISBN 978-1-882691-21-0. Version 2013.0.1.
20. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 20.10.2010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работы проведены в рамках Государственного контракта № 14.N08.12.0167 от 07.09.2017 «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата с ^{90}Y для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов с первичными и метастатическими опухолями печени» между АО «ГНЦ РФ-ФЭИ» и Министерством образования и науки Российской Федерации с привлечением внебюджетных средств АО «ГНЦ РФ-ФЭИ».

Financing. The work was carried out under the State contract No. 14. N08. 12. 0167 dated 07.09.2017 «Preclinical research of a radiopharmaceutical drug with ^{90}Y for intra-arterial radioembolization of inoperable patients with primary and metastatic liver tumors» between JSC «SSC RF-FEI» and the

Ministry of education and science of the Russian Federation with the involvement of extra-budgetary funds of JSC «SSC RF-FEI».

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 17.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 17.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Klementyeva O.E. <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>.

Lunyova K.A. <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>.

Ternovskaya K.E. <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>.

О.П. Власова¹, Е.Д. Степченкова¹, В.М. Петриев^{1,2}, О.Е. Клементьева², Д.В. Степченков⁴,
А.С. Красноперова³, А.А. Кузнецов⁴, Н.А. Нерозин⁴, С.А. Иванов¹, А.Д. Каприн¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТА «ДТПА-МИКРОСФЕРЫ АЛЬБУМИНА, ⁹⁰Y»

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

³ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

⁴ АО ГНЦ РФ — Физико-энергетический институт, Обнинск

Контактное лицо: Власова Оксана Петровна, somina@inbox.ru

РЕФЕРАТ

Цель: 1. Разработка технологии получения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) на основе меченных ⁹⁰Y модифицированных микросфер альбумина крови человека. 2. Проведение исследования функциональной пригодности препарата на экспериментальных животных.

Материал и методы: Изучались следующие характеристики РФЛП: динамика распределения и выведения после его внутриартериального введения; механизм действия РФЛП в организме животных с модельной патологией; терапевтическая эффективность РФЛП у животных с моделью опухоли печени.

Были заявлены следующие физико-химические характеристики разрабатываемого РФЛП: модифицированные ДТПА и меченные ⁹⁰Y микросферы альбумина крови человека, размер частиц 25–40 мкм, радиохимические примеси менее 5,0%, радионуклидные примеси по ⁹⁰Sr менее 0,002%, химические примеси (Na, Al, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb) в сумме не более 10 мкг/ГБк, объемная активность до 150 МКи/мл на дату приготовления. В качестве экспериментальных животных были взяты крысы-самки линии Sprague Dawley (масса тела 220–260 г). Исследования проводили на модельной патологии — гепатоцеллюлярной карциноме, встречающейся в 85% случаев всех злокачественных опухолей печени человека.

Результаты: В 2018–2019 гг. были наработаны 9 опытных партий РФЛП, удовлетворяющие заявленным характеристикам. Отмечено стабильное торможение роста опухолевых очагов на 7,62%. Качество жизни у животных с ортотопическими опухолевыми очагами гепатокарциномы, получавших лечение, было лучше, чем у животных, не получавших лечение. Продолжительность жизни у группы животных, прошедших терапию препаратом, была выше, чем у группы животных, не получивших лечение, на 7,1%. Распределение РФЛП характеризовалось легочным шунтированием, не превышающим 9% от введенной активности и минимальным пробросом в циркулирующую кровь. РФЛП прочно удерживался в месте введения и оставался почти неизменным в течение всего времени исследования. Связывание с опухолевым очагом препарата характеризовалось удержанием не менее 78% введенной активности.

Заключение: Проведенные доклинические исследования фармакокинетики РФЛП показывают его потенциальную пригодность для лечения рака печени методом трансартериальной радионуклидной эмболизации. По результатам доклинических исследований терапевтической эффективности РФЛП его следует считать эффективным для клинического применения.

Ключевые слова: радиофармацевтический лекарственный препарат, микросферы альбумина, иттрий-90, рак печени, радионуклидная эмболизация, доклинические испытания, фармакокинетика, эффективность

Для цитирования: Власова О.П., Степченкова Е.Д., Петриев В.М., Клементьева О.Е., Степченков Д.В., Красноперова А.С., Кузнецов А.А., Нерозин Н.А., Иванов С.А., Каприн А.Д. Результаты доклинических испытаний эффективности радиофармпрепарата «ДТПА-микросферы альбумина, ⁹⁰Y». Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):60–7.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-60-67

Введение

Данные канцеррегистра МНИОИ им. П.А. Герцена свидетельствуют о том, что количество заболевших первичным раком печени с каждым годом увеличивается. Если в 2007 г. в России было зарегистрировано 6471 человек с диагнозом первичного рака печени, то к 2017 г. количество зарегистрированных пациентов с аналогичным заболеванием увеличилось на 33% и составило 8623 человека [1, 2].

Метастатические опухоли печени регистрируют на порядок чаще, чем первичные, поскольку печень является одним из самых часто поражаемых метастазами органом, что связано с ее функцией в организме и соответствующим характером кровоснабжения. Наиболее часто заболевают вторичным раком печени пациенты, имеющие злокачественные образования в кишечнике, желудке и поджелудочной железе, а также легких и органах мочеполовой системы. Как правило, больные с метастатическими поражениями печени

встречаются в 30–40 раз чаще, чем с первичным раком печени. Метастатический рак печени обычно характеризуется быстрым прогрессированием и отсутствием специфических лабораторных и клинических признаков. Прогноз по данному заболеванию неутешительный. Половина таких пациентов умирают в первый год диагностирования болезни [3].

Лечение рака печени зависит от стадии заболевания и может включать в себя оперативное лечение, лучевую терапию, химиотерапию. Единственным методом, позволяющим добиться длительной выживаемости при первичном раке печени, является хирургическая операция. В России основным методом лечения больных раком желудка, ободочной кишки, печени, легкого, почки, мочевого пузыря, прямой кишки, щитовидной железы, костей и суставных хрящей, меланомы кожи является хирургический метод (55–89%) [3, 4]. Однако в большинстве случаев к моменту диагностики злокачественного новообразования

печени радикальное удаление опухоли возможно лишь у 5–15% больных. Рецидив опухоли в течение 3–5 лет после резекции печени наблюдается у 60–90% пациентов, из них повторную резекцию удается выполнить не более чем у 10% пациентов. Таким образом, очевидно, что в нехирургической противоопухолевой терапии рака печени нуждаются до 80% больных [5, 6].

Для лечения больных с нерезектабельным поражением печени в России используют системную химиотерапию или методы локорегионарного воздействия, включающие химиоинфузию и химиоэмболизацию печеночной артерии. Также с 2002 г. за рубежом эффективно стали применять локальную радионуклидную терапию методом трансартериальной радиоэмболизации (ТАРЭ) микросферами с радионуклидом ^{90}Y , а с 2010 г. — лечение РФЛП с ^{131}I -липидолом (LipioCis).

ТАРЭ — методика, которая предполагает сочетание эмболизации и радионуклидной терапии. Она проводится путем введения в печеночную артерию микроразмерных радиоактивных частиц в виде микросфер. Терапевтическая доза излучения достигается в течение 2 нед от момента введения. При отсутствии противопоказаний к процедуре выбирают дозу предполагаемого облучения обычно в пределах 120–150 Гр [7, 8].

В 2002 г. FDA (Food and Drug Administration) США санкционировала клиническое использование полимерных микросфер с ^{90}Y (SIR-spheres, Sirtex Medical, Австралия) и в 2004 г. — стеклянных микросфер ^{90}Y (Theraspheres, MDS Nordion, Канада) для лечения гепатоцеллюлярного рака и метастазов колоректального рака в печень [5, 6]. В настоящее время этот метод разрешен в качестве лечения злокачественных опухолей печени разного генеза во многих странах мира, в том числе и в России.

Иттрий-90 (^{90}Y) уже более тридцати лет применяют в радионуклидной терапии благодаря его подходящим физико-химическим характеристикам. Являясь чистым бета-излучателем, ^{90}Y имеет период полураспада 64 ч, что минимизирует лучевую нагрузку на организм пациента. Кроме того, максимальная энергия бета-частиц ^{90}Y составляет 2,28 МэВ (0,9 МэВ — средняя энергия), поэтому они способны проникать на глубину до 13 мм (в среднем 4 мм) в мягкой биологической ткани [2, 9].

Микросферы с ^{90}Y проникают по капиллярам в опухолевый очаг примерно на 3,5 мм. Так как скорость кровотока и количество капилляров в опухоли в 3–7 раз больше, чем в окружающих тканях, создается целенаправленная доставка микросфер по капиллярам в ложе опухоли и высокая доза локального облучения опухоли (120–200 Гр) при относительно небольшом облучении здоровой, окружающей опухоль, ткани печени (20–30 Гр). Для достижения этого эффекта микросферы необходимо ввести как можно более точно в артерии, питающие новообразование, и одновременно избежать попадания частиц по шунтам в соседние органы [7, 8].

На сегодняшний день сформированы лечебные протоколы ТАРЭ под рентгеновским контролем с

применением микросфер на основе радионуклида ^{90}Y , разработаны системы дозиметрического планирования, успешно пролечено более 30 тыс. пациентов в странах Европы и США [5–7]. В 2017 г. United Healthcare Oxford Clinical Policy (УНОСР) издало руководство по ТАРЭ, которое базировалось на анализе различных мировых клинических практик по селективной внутренней радиационной терапии (SIRT) или, иначе, радионуклидной эмболизации микросферами с ^{90}Y , в США и Европе с 1996 по 2017 гг. По заключению УНОСР, ТАРЭ с ^{90}Y клинически показана и является необходимой с медицинской точки зрения для следующих поражений:

- радиочувствительные к излучению метастатические опухоли печени от первичного колоректального рака;

- радиочувствительные метастазы в печени от нейроэндокринных опухолей;

- неоперабельная первичная гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК).

Ограниченные данные свидетельствуют о том, что ТАРЭ может угнетать рост опухоли и облегчать симптомы у некоторых пациентов, иногда достаточно, чтобы сделать неоперабельную опухоль операбельной. Однако не выявлено статистически значимого увеличения выживаемости. Кроме того, до сих пор не изучалось потенциальное воздействие лечения на качество жизни [7, 8].

Клинический опыт ТАРЭ в России составляет на настоящий момент лишь 8 наблюдений: в 2009 г. ТАРЭ стеклянными микросферами, содержащими ^{90}Y , осуществлена в РНЦРХТ Минздрава РФ (Санкт-Петербург) у 4 больных. В 2011 г. 1 операция была проведена в ГКБ № 55 (Москва). К началу 2012 г. еще две процедуры ТАРЭ стеклянными микросферами были выполнены специалистами НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ (Москва). И, наконец, еще одна процедура ТАРЭ стеклянными микросферами с ^{90}Y производства ООО «Бебиг» была проведена в мае 2019 г. в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск) [2, 4, 5].

Причина столь ограниченного клинического применения этого метода лечения в России связана как с достаточно высокой стоимостью процедуры ТАРЭ зарубежными препаратами (порядка 1,5 млн руб.), так и со сложной логистикой зарубежных препаратов с ^{90}Y в российские клиники, вследствие короткого периода полураспада радионуклида (64 ч) [5, 9].

Целью настоящего исследования являлась разработка технологии получения РФЛП на основе меченных ^{90}Y модифицированных диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПА) микросфер альбумина крови человека, а также проведение исследования функциональной пригодности препарата на экспериментальных животных.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Получение готовой лекарственной формы РФЛП по разработанной опытно-промышленной технологии с заданными физико-химическими параметрами.

2. Изучение терапевтического эффекта и функциональной пригодности РФЛП терапевтической активности в эквивалентном пересчете на лабораторных животных.

3. Исследование фармакокинетики РФЛП.

Материал и методы

Активную фармацевтическую субстанцию (АФС ^{90}Y) производят в АО «ГНЦ РФ — ФЭИ» (Калужская область, г. Обнинск). Препарат представляет собой стерильный раствор хлорида ^{90}Y в 0,04 М растворе хлористоводородной кислоты. Препарат соответствует по качеству и является аналогом препарата «Стерильный

Таблица 1

Основные физико-химические характеристики АФС ^{90}Y (АО «ГНЦ РФ — ФЭИ»)

Basic physical and chemical characteristics of ^{90}Y active pharmaceutical substance (IPPE JSC)

Показатель	Норма
Внешний вид	Бесцветная прозрачная жидкость
Химическая форма	$^{90}\text{YCl}_3$, хлорид иттрия-90 в 0,04 М растворе хлористоводородной кислоты
Объемная активность	Не менее 5,5 (150) ГБк/мл (мКи/мл),
Объем, мл	0,5–5,0
Калибровка по активности	3 сут от даты производства
Радионуклидные примеси, %, не более: ^{90}Sr другие γ -излучающие	0,002 0,01
Химические примеси, мкг/ГБк: Na, Al, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, в сумме не более	10,0
Стерильность	Стерильный
Содержание бактериальных эндотоксинов, не более	35 ЕЭ/мл
Срок годности, сутки от даты производства	5

Таблица 2

Основные физико-химические характеристики «Микросферы альбумина-ДТПА, лиофилизат»

Basic physical and chemical characteristics of «Albumin Microspheres-DTPA, lyophilisate»

Показатель	Норма
Внешний вид	Ллиофилизат желтоватого цвета
Размер частиц	25–40 мкм
Стерильность	Стерильны
Пирогенность	Апирогенны
Срок годности	6 мес от даты производства
Хранение	Хранят в холодильнике в хорошо закупоренных флаконах при температуре +2 °С до +8 °С
Комплектность	Один флакон содержит 20 мг субстанции «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм» и 1 мг Твина-80; рассчитан на получение одного флакона готовой лекарственной формы РФЛП «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм, ^{90}Y »

раствор иттрия-90, ^{90}Y хлорид», зарегистрированного в Европе как фармацевтическая субстанция для изготовления РФЛП (регистрационное удостоверение ЕУ /1/05/322/001). Основные характеристики АФС ^{90}Y представлены в табл. 1.

Микросферы альбумина, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПА-Микросферы альбумина, лиофилизат) производят в МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Основные характеристики «Микросферы альбумина-ДТПА, лиофилизат» представлены в табл. 2.

РФЛП для проведения доклинических испытаний готовили в АО «ГНЦ РФ — ФЭИ» (лаборатория радиофармпрепаратов НПК ИиРФП) по разработанной в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (лаборатория экспериментальной ядерной медицины) опытно-промышленной технологии. Всего в 2018–2019 гг. было наработано 9 серий РФЛП терапевтической активности.

Изучение функциональной пригодности РФЛП проводилось в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России в лаборатории доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов с применением методик, описанных в [10, 11].

Для исследований функциональной пригодности РФЛП «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм, ^{90}Y » использованы: крысы линии Sprague Dawley, самки, средняя масса тела 220–260 г. Животные получены из сертифицированных питомников лабораторных животных «Пушино» ФИБХ РАН.

Исследования проводили на модельной патологии — гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК), встречающейся в 85 % случаев всех злокачественных опухолей печени [3]. Для моделирования ортотопических очагов ГЦК была использована культура опухолевых клеток ГЦК крыс линии N1-S1, полученная из опухолевого очага ГЦК, индуцированной 4-диметиламиноазобензолом у самца крысы линии Sprague-Dawley. Опухолевый штамм N1-S1 получен из банка клеточных культур Американской коллекции типовых культур (ATCC) в виде замороженного образца [Product Sheet N1S1 (ATCC® CRL1604™)].

Опухоль перевивали крысам-самкам линии Sprague-Dawley со средней массой тела 240 ± 20 г, которым стерильно вводили в ткань печени опухолевые клетки в количестве 6×10^6 клеток в 0,15 мл среды DMEM. На 14-е сут после перевивки опухоли крысам с установленной на УЗИ опухолью внутриартериально вводили РФЛП.

При исследовании фармакокинетики накопление (A_k) РФЛП в органах (кровь, легкие, сердце, желудок с содержимым, печень/печень с ГЦК, почки, селезенка, кишечник) крыс рассчитывали по формуле (1) [8, 9]:

$$A_k = \frac{A_{\text{пробы}}}{A_{\text{эталон}}} \times 100 \%, \quad (1)$$

где $A_{\text{пробы}}$ — счет от образца в имп/мин, $A_{\text{эталон}}$ — счет от суммарной активности всего тела животного в имп/мин.

Таблица 3

Физико-химические характеристики РФЛП «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм, ⁹⁰Y»
Physical and chemical characteristics of radiopharmaceutical «ДТПА-albumin microspheres, 25–40 μm, ⁹⁰Y»

№ серии	Дата наработки	⁹⁰ Sr, %	Химические примеси в Σ, мкг/ГБк	Объем, мл		Объемная активность МБк/мл (мКи/мл)	
0106030518	04.05.18	0,001	5	3,18		3180 (86,0)	
0207230518	23.05.18	0,001	5	1,00		5650 (152,7)	
0309040818	04.08.18	0,001	8	1,90		1530(41,2)	
0511071018	07.10.18	0,001	7	2,00		2060 (55,7)	
0101290319	29.03.19	0,001	7	0,84	0,94	251,4(9,3)	224,6(8,3)
0202170419	17.04.19	0,001	5	1,08	1,08	153,6(5,68)	154,1(5,7)
0303170519	17.05.19	0,001	5	0,94	0,94	162,2(6,0)	163,3(6,04)
0404290519	29.05.19	0,001	5	1,20		163,3(6,04)	
0505060619	06.06.19	0,001	6	1,30		161,2(5,97)	

Коэффициент дифференциального накопления РФЛП (КДН) рассчитывали как отношение накопления вводимого РФЛП в целевых тканях (тканях-мишенях) к нецелевым, и вычисляли по формуле (2) [9, 11].

$$КДН = \frac{A_m}{A_{nm}}, \quad (2)$$

где A_m — накопление исследуемого РФЛП в 1 г целевой ткани, A_{nm} — накопление РФЛП в 1 г нецелевой ткани [11].

Результаты и обсуждение

Результаты контроля качества 9 стерильных и апирогенных серий РФЛП, наработанных в АО «ГНЦ РФ — ФЭИ» в 2018–2019 гг., представлены в табл. 3.

Для проведения доклинических испытаний в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России были направлены первые три серии наработанного РФЛП. Результаты этих доклинических испытаний представлены в данном номере журнала (С. 51–59).

Для оценки фармакокинетики и функциональной пригодности РФЛП по терапевтическому эффекту после введения препарата в артерию печени лабораторных животных с моделью ГЦК, основными критериями были выбраны: минимальное внепеченочное накопление (поглощенные дозы в интактной ткани печени $\leq 4,5 \pm 1,9$ Гр; легких $\leq 4,1 \pm 1,2$ Гр; почках $\leq 0,9 \pm 0,7$ Гр), легочное шунтирование $\leq 5\%$ от введенной активности, поглощенная доза в опухолевом очаге $\geq 22,5$ Гр.

Изучение механизма терапевтического действия РФЛП проводилось путем оценки его противоопухолевого терапевтического действия по следующим критериям: торможение роста опухоли; увеличение продолжительности жизни; улучшение качества жизни.

Исследование торможения роста опухоли было проведено с использованием 2 групп крыс (25 крыс в контрольной группе № 1 и 25 крыс в группе с введением РФЛП № 2). Группе животных № 2 было выполнено внутриартериальное (в артерию печени) вве-

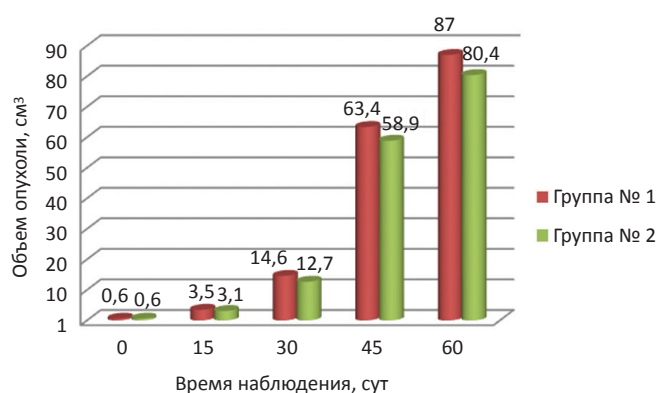


Рис. 1. Изменение среднего объема опухоли
 Fig. 1. Change in mean tumor volume

дение РФЛП с активностью 59,7 МБк ⁹⁰Y на каждое животное, что соответствует эквивалентной терапевтической активности порядка 3000 МБк человека [11]. Животным группы контроля вместо РФЛП внутриартериально был введен физиологический раствор [12].

В день введения РФЛП (или физиологического раствора) крысам и через каждые последующие 15 дней было умерщвлено по 5 животных из групп № 1 и № 2, проведены необходимые измерения и расчеты. Морфометрическая характеристика органов выполнена по показателям: спленомегалия, гепатомегалия, увеличение лимфоузлов, наличие метастазов, спаечный процесс, изменение паренхимы печени.

Результаты изменения объемов опухолей у крыс групп № 1 и № 2 в течение 60 сут приведены на рис. 1.

В целом во все сроки наблюдения у животных группы № 2 средний объем опухоли меньше, по сравнению с животными в группе № 1. Полученные результаты показывают, что у животных группы «леченые» отмечено стабильное торможение опухолевого роста, причем более сильное действие РФЛП отмечается в первые дни терапии и составляет 13%, затем оно несколько снижается до значения 7,6% на 60-е сут наблюдения.

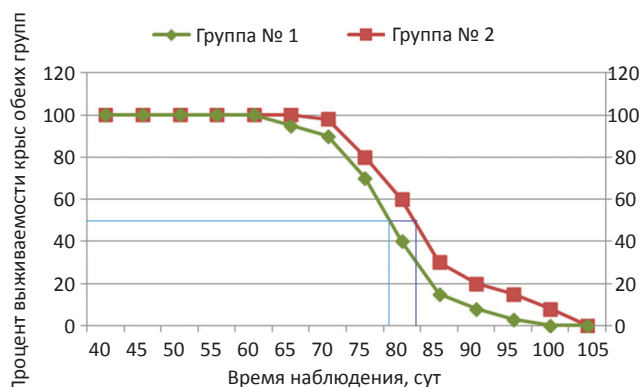


Рис. 2. Кривые выживаемости (линиями отмечены медианы выживаемости)

Fig. 2. Survival curves (the lines indicate the median survival)

По результатам выполненной патоморфологической оценки внутренних органов крыс обеих групп было обнаружено, что в группе животных без терапии (№ 1) патологический процесс развивался значительно быстрее и давал осложнения на другие органы. В группе № 1 зафиксирован более активный спаечный процесс близлежащих органов, увеличение селезенки у 80% особей на 60 сут. У групп «леченых» животных наблюдались менее ярко выраженные патоморфологические изменения (спленомегалия только у 40%, гепатомегалия, нарушение паренхимы печени, увеличение лимфоузлов, спаечный процесс) с 45 по 60 сут после терапии.

Исследование увеличения продолжительности жизни и оценку качества жизни проводили на животных, разделенных на 2 экспериментальные группы (40 крыс в контрольной группе № 1 и 40 крыс в группе № 2 с введением РФЛП). Контрольной группе крыс был введен стерильный изотонический раствор хлорида натрия в объеме, равном объему введенного РФЛП.

Расчеты продолжительности жизни проводились по результатам наблюдаемой гибели животных в обеих группах. Оценку качества жизни животных обеих групп проводили каждые 10 сут в течение 60 сут после

введения РФЛП и физраствора по показателям: активность движений, сутулая поза, нахохливание, кожные покровы, диарея, дегидратация, захваты и конвульсии, поедание корма, кровотечения.

На рис. 2 представлены кривые выживаемости животных в обеих группах.

Из графика видно, что выживаемость в опытной группе животных № 2 выше, чем в контрольной группе. Медиана выживаемости для группы № 1 составила 78 сут, а для группы № 2 — 84 сут. Полученные результаты показывают увеличение продолжительности жизни крыс в группе № 2 по сравнению с группой нелеченых особей (№ 1) на 7%. Эти результаты подтверждают наличие терапевтического действия исследованного радиофармпрепарата.

Также было доказано улучшение качества жизни животных с модельной патологией гепатокарциномы после терапии РФЛП. По результатам оценки внешних признаков качества жизни можно видеть, что в группе № 1 уже на 30-е сут отмечалась диарея, вялость при движении, плохое поедание корма, нагноения на коже, захваты и конвульсии на последних неделях, истощение. В группе № 2 до 45-х сут видимых ухудшений не наблюдалось, животные были активны, потребление корма было в норме.

Можно сделать вывод, что общее состояние животных с модельной патологией ГЦК после терапии РФЛП на протяжении всего периода исследования было лучше, чем у животных, не получавших терапию.

Фармакокинетику РФЛП определяли путем исследования динамики процессов распределения и выведения препарата после его введения в печеночную артерию у крыс-самок в норме (группа № 1) и крыс-самок с моделью патологии (группа № 2). В каждой группе было по 30 особей. Животным внутриартериально в гастродуоденальную артерию вводили РФЛП активностью 33 МБк в объеме 0,05 мл. После введения препарата через 3, 24, 48, 72, 96 и 120 ч по 5 животных из каждой группы умерщвляли с последующим отбором проб органов и тканей для определения в них содержания радионуклида ^{90}Y методом прямой радиометрии с использованием автоматического гамма-счетчика Wizard 2480 (PerkinElmer, USA). Содержание

Таблица 4

Динамика распределения РФЛП после его внутриартериального введения у крыс в норме
(% от введенной дозы/орган)

Trends in distribution of radiopharmaceutical after intra-arterial administration in normal rats
(% of the administered dose per organ)

Орган, ткань	Время после введения препарата, ч					
	3	24	48	72	96	120
Кровь	0,29±0,05	0,17±0,06	0,11±0,02	0,07±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01
Легкие	9,23±0,43	9,53±0,55	8,33±1,12	7,27±0,76	7,64±0,29	7,71±0,26
Сердце	0,19±0,04	0,65±0,14	0,35±0,13	0,24±0,03	0,22±0,04	0,19±0,03
Желудок	8,70±1,48	5,23±1,42	0,87±0,13	1,75±0,35	1,68±0,30	1,55±0,44
Печень	68,56±1,76	67,14±2,73	68,21±2,40	71,31±1,32	73,78±0,64	72,81±3,50
Почки	5,96±0,88	11,25±1,22	11,85±0,73	12,35±1,17	11,53±0,45	10,85±0,60
Селезенка	0,98±0,22	0,84±0,27	1,83±0,43	2,00±0,52	0,59±0,14	0,17±0,06
Кишечник	4,71±0,74	4,76±0,80	8,27±1,18	4,84±0,70	4,49±0,65	5,78±0,90

Таблица 5

Динамика распределения РФЛП после его внутриартериального введения у крыс с моделью патологии (% от введенной дозы/орган)**Trends in distribution of radiopharmaceutical after intra-arterial administration in rats with pathology (% of the administered dose per organ)**

Орган, ткань	Время после введения препарата, ч					
	3	24	48	72	96	120
Кровь	0,29±0,05	0,17±0,06	0,11±0,02	0,07±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01
Легкие	8,78±0,97	8,23±0,57	6,87±1,04	6,01±1,64	4,96±1,02	4,88±1,04
Сердце	0,29±0,11	1,17±0,57	0,38±0,20	0,18±0,10	0,47±0,15	0,24±0,08
Желудок	5,40±1,38	2,06±0,30	3,80±0,80	2,40±1,09	0,73±0,21	0,41±0,11
Печень	73,82±4,62	69,95±4,68	72,00±8,07	72,94±2,87	78,37±0,80	78,03±1,74
Почки	4,69±0,74	11,55±2,25	11,64±5,58	10,33±2,16	9,86±1,04	8,10±1,89
Селезенка	0,40±0,26	0,63±0,23	3,48±0,52	0,69±0,28	0,27±0,12	0,23±0,09
Кишечник	5,15±1,12	7,41±2,40	3,67±0,38	4,70±2,51	4,66±1,77	4,39±0,59

Таблица 6

Расчетные значения КДН
Calculated values of differential uptake ratios

КДН	Время после введения препарата, ч					
	3	24	48	72	96	120
КДН ₁	14,60±4,95	34,50±5,27	20,20±7,82	36,90±20,1	119,40±49,4	200,50±59,0
КДН ₂	8,50±1,14	8,52±0,71	10,80±2,67	13,00±4,15	16,40±3,75	16,60±3,25
КДН ₃	16,20±3,64	6,26±1,35	7,50±3,61	7,28±1,34	8,03±0,89	10,10±2,57

РФЛП в пробе выражали в процентах от всей активности, зарегистрированной в тушке животного на весь исследуемый орган (%/орган), а для проб крови на 1 г ткани (%/г). В табл. 4 и 5 представлены полученные результаты динамики распределения РФЛП в организме крыс группы №1 и группы №2 соответственно. Содержание РФЛП в пробе выражено в процентах от всей активности, зарегистрированной в тушке животного на весь исследуемый орган (%/орган), а для проб крови — на 1 г ткани (%/г).

Из результатов исследования можно видеть, что в первые 24 ч (в группе №1) после введения РФЛП в опухолевый очаг в циркулирующей крови и других органах отмечается незначительная радиоактивность, которая затем постепенно снижается. Этот эффект можно объяснить процессом выведения ^{90}Y из микросфер и его миграции в ионной форме. Наибольшее накопление и прочное удержание РФЛП отмечено для печени, которое достигается практически сразу и остается неизменным на протяжении всего времени исследования.

Из табл. 5 видно, что в течение всех 120 ч после введения препарата крысам наибольшее количество РФЛП было аккумулировано в печени с опухолевым очагом. Меньшее, по сравнению с животными в группе №1, накопление активности в желудке животных группы №2 свидетельствует о нарушениях ферментативной функции печени при опухолевом процессе, и, как следствие, о снижении активности воздействия ферментов желудочно-кишечного тракта на микросферы альбумина.

Функциональная пригодность РФЛП определялась по таким характеристиками, как тропность (степень привязанности РФЛП к пораженной ткани печени) и коэффициент дифференциального накопления [9, 10]. Нетаргетными тканями в данном исследовании являлись желудок, легкие и почки, а таргетным — печень с очагом ГЦК.

По полученным данным (табл. 4 и 5) распределение РФЛП в организме крыс с экспериментальными опухолевыми очагами характеризуется легочным шунтированием, не превышающим 8,8% от введенной активности. Незначительное отклонение от значения легочного шунтирования, принятого в качестве критерия функциональной пригодности (5%), не является фатальным и может быть связано с наличием визуально не определяемых микрошунтов у крыс.

В организме крыс с ГЦК накопление препарата в опухолевой ткани печени происходит быстро и практически остается стабильным на протяжении 120 ч. Связывание с опухолевым очагом РФЛП характеризуется удержанием до 75% активности, что дает сделать вывод о тропности препарата к опухолевым очагам ГЦК.

В ходе исследования были рассчитаны: КДН₁ — соотношение накопленных активностей в печени и желудке, КДН₂ — в печени и легких, КДН₃ — в печени и почках, представленные в табл. 6.

Исходя из полученных значений КДН можно предположить, что подведенная терапевтическая доза бета-излучения ^{90}Y в опухолевом очаге будет существенно выше, чем в остальных органах.

Выводы

1. В результате исследований по разработанной опытно-промышленной технологии были получены образцы РФЛП с заданными физико-химическими характеристиками.

2. В результате изучения терапевтического эффекта и функциональной пригодности РФЛП с лечебной активностью в эквивалентном пересчете на лабораторных животных было показано улучшение общего состояния животных (сохранение двигательной активности, уровня потребления корма и воды, функций пищеварения), и, как следствие, улучшение качества жизни.

3. Наблюдалось увеличение продолжительности жизни животных с имплантированными опухолями печени после введения им РФЛП с ^{90}Y на 7,1 % по сравнению с нелечеными животными.

4. Отмечалось снижение скорости развития патологических процессов, затрагивающих органы, выполняющие жизненно важные функции.

5. Максимальное торможение роста опухоли наблюдалось с 15 по 30 сут после введения РФЛП, со-

ставляя ~ 13,3 % с замедлением до 7,62 % на конец срока наблюдения.

6. В ходе исследования фармакокинетики было установлено, что легочное шунтирование составляет не более 9 % от введенной активности, а проброс РФЛП в циркулирующую кровь минимальный.

7. В организме крыс с гепатоцеллюлярной карциномой накопление РФЛП в опухолевом очаге печени происходило быстро и оставалось практически неизменным на протяжении 120 ч.

8. Связывание с опухолевым очагом РФЛП характеризовалось его удержанием до 75 % активности, что дает сделать вывод о тропности препарата к опухолевым очагам гепатокарциномы.

Таким образом, изученный радиофармацевтический лекарственный препарат «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм, ^{90}Y » отвечает заявленным критериям терапевтического действия, как радиофармацевтический лекарственный препарат для внутриартериальной радионуклидной терапии гепатоцеллюлярной карциномы и метастатических поражений.

The Preclinical Test's Results of the Efficiency of the Radiopharmaceutical Preparation "DTPA-Microspheres of Albumin, ^{90}Y "

O.P. Vlasova¹, E.D. Stepchenkova¹, V.M. Petriev^{1,2}, O.E. Klementyeva², D.V. Stepchenkov⁴,
A.S. Krasnoperova³, A.A. Kuznetsov⁴, N.A. Nerozin⁴, S.A. Ivanov¹, A.D. Kaprin¹

¹ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

³ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

⁴ A.I. Leypunsky Institute for Physics and Power Engineering, Obninsk, Russia

E-mail: somina@inbox.ru

ABSTRACT

Purpose: Development of technology for producing a radiopharmaceutical based on ^{90}Y labeled modified human blood albumin microspheres, and the study of the functional suitability of this drug in experimental animals.

Material and methods: The research team studied the following characteristics of the drug: the distribution and excretion of the drug after its intra-arterial administration; the mechanism of action of the drug in animals with model pathology; therapeutic efficacy of the drug in animals with a liver tumor model. The following physicochemical characteristics of the developed radiopharmaceutical were announced: modified with DTPA and labeled ^{90}Y human blood albumin microspheres, particle size 25–40 microns, radiochemical impurities less than 5.0 %, ^{90}Sr radionuclide impurities less than 0.002 %, the amount of chemical impurities (Na, Al, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb) not more than 10 μg / GBq, volumetric activity up to 150 mCi / ml at the date of preparation. Sprague Dawley female rats were taken as experimental animals (body weight 220–260 g). Studies were conducted on a model pathology — hepatocellular carcinoma, which occurs in 85 % of all malignant tumors of the human liver.

Results: In 2018–2019, 9 pilot batches of the radiopharmaceutical product satisfying the declared characteristics were developed. Stable inhibition of the growth of tumor lesions by 7.6 % was noted. The quality of life in animals with orthotopic tumor foci of hepatocarcinoma treated was better than in animals not treated. Life expectancy in the group of animals treated with the drug was higher than in the group of animals that did not receive treatment by 7.1 %. The distribution of the drug was characterized by pulmonary bypass, not exceeding 9 % of the injected activity and minimal forwarding into the circulating blood. The radiopharmaceutical was firmly held at the injection site and remained almost unchanged throughout the study. Binding to the tumor site of the drug was characterized by retention of at least 78 % of the introduced activity.

Conclusion: Conducted preclinical studies of the pharmacokinetics of the drug show its potential suitability for the treatment of liver cancer by radionuclide embolization. According to the results of preclinical studies of the therapeutic effectiveness of the radiopharmaceutical, it should be considered effective for use.

Key words: radiopharmaceutical, albumin microspheres, yttrium-90, liver cancer, radionuclide embolization, preclinical trials, pharmacokinetics, efficiency

For citation: Vlasova OP, Stepchenkova ED, Petriev VM, Klementyeva OE, Stepchenkov DV, Krasnoperova AS, Kuznetsov AA, Nerozin NA, Ivanov SA, Kaprin AD. The Preclinical Test's Results of the Efficiency of the Radiopharmaceutical Preparation "DTPA-Microspheres of Albumin, ^{90}Y ". Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):60–7 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-60-67

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 г. (заболеваемость и смертность) Под ред. Каприна АД, Старинского ВВ, Петровой ГВ. М., 2018. 250 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Ed by Kaprin AD, Starinsky VV, Petrova GV. Moscow. 2018 (In Russ.)].
2. Kaprin AD, Mardinskiy YS, Smirnov VP, Ivanov SA, Kostin AA, Polikhov SA, et al. The History of Radiation Therapy (part I). Biomedical Photonics. 2019;8(1):52-62.
3. Подымова СД. Болезни печени: Руководство. 4-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005, 768 с.: [Podymova SD. Liver Disease: A Guide. 4th ed. Moscow. 2005. 768 p. (In Russ.)].
4. Таразов ПГ. Рентгеноэндovasкулярные вмешательства в лечении первичного рака печени. Практическая онкология. 2008;9(4):209-15. [Tarazov PG. X-ray endovascular interventions in the treatment of primary liver cancer. Practical Oncology. 2008;9(4):209-15. (In Russ.)].
5. Таразов ПГ. Артериальная радиоэмболизация злокачественных опухолей печени микросферами ^{90}Y . Вопросы онкологии. 2013;59(4):428-34. [Tarazov PG. Arterial radioembolization of malignant liver tumors with ^{90}Y microspheres. Oncology Issues. 2013;59(4):428-34. (In Russ.)].
6. Abdelmaksoud MHK, Louie JD, Kothary N, et al. Consolidation of hepatic arterial in flow by embolization of variant hepatic arteries in preparation for yttrium-90 radioembolization. J Vasc Interv Radiol. 2011;22:1364-71.
7. Implantable Beta-Emitting Microspheres for Treatment of Malignant Tumors. United Healthcare® Oxford, Clinical Policy, Policy Number: CANCER 036.9, 2017:2, January 1.
8. Salem R, Lewandowski RJ, Gates VL, Nutting CW, Murthy R, Rose SC, et al. Research Reporting Standards for radioembolization of Hepatic Malignancies. J Vasc Interv Radiol. 2011;22:265-78.
9. Кодина ГЕ, Красикова РН. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. М., МЭИ, 2014, 282 с. [Kodina GE, Krasikova RN. Methods for producing radiopharmaceuticals and radionuclide generators for nuclear medicine. Moscow. 2014. 282 p. (In Russ.)].
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012, 244 с. [Guidelines for preclinical studies of drugs. Part I. Ed. A.N. Mironov. Moscow, 2012, 244 p. (In Russ.)].
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд, перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed by RU Khabriev. 2nd ed. Moscow. 2005. 32 p. (In Russ.)].
12. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава СССР № 755). М. 1977. [Rules for conducting work using experimental animals (Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755). Moscow. 1977. (In Russ.)].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 15.10.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 15.10.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Klementyeva O.E. <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>.

Lunyova K.A. <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>.

Ternovskaya K.E. <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>.

Krasnoperova A.S. <https://orcid.org/0000-0003-4254-0905>.

Е.В. Липова, М.Р. Рахматулина, И.И. Глазко, А.С. Чекмарев

ЛАЗЕРНЫЕ И РАДИОВОЛНОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ И КОСМЕТОЛОГИИ

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Рахматулина Маргарита Рафиковна, ra.marg@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Представлены современные данные о применении лазерных и радиоволновых методик в дерматологии и косметологии. Охарактеризованы виды лазеров, реакции взаимодействия лазерного света с кожными покровами, дана подробная характеристика низкоинтенсивного и высокоинтенсивного лазерного излучения и возможностей их применения в дерматологии и косметологии. Описаны абляционные и неабляционные методы воздействия на кожу, принцип фракционного лазерного фототермолиза. Представлен метод радиоволнового воздействия на ткани и его режимы. Обсуждены принципы радиоволновой хирургии и возможности применения радиоволновых методик в терапии новообразований кожи и эстетической косметологии. Описаны данные по применению режима Plasma RFL для плазменного омоложения кожи.

Ключевые слова: лазерные технологии, фототермолиз, электрохирургические методы, радиоволновая деструкция, дерматозы, косметология, plasma RFL

Для цитирования: Липова Е.В., М Рахматулина.Р., Глазко И.И., Чекмарев А.С. Лазерные и радиоволновые технологии в дерматологии и косметологии. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):68-76.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-68-76

Введение

Применение лазерных и радиоволновых методик в дерматологии и косметологии в России имеет более чем пятидесятилетнюю историю, но пик развития данных направлений приходится на последнее десятилетие. Это во многом связано с созданием современных, более эффективных и безопасных аппаратов, изучением свойств лазерного излучения различных видов, оценкой их влияния на отдельные типы тканей и патологий и разработкой на основе полученных данных новых методик лечения. В настоящее время существует большое количество дерматологических лазерных аппаратов, обладающих разными физическими характеристиками: типом излучающего вещества, мощностью, энергией, длительностью лазерного импульса и т.д. Лазерное излучение в известном диапазоне параметров способно рассекать и препарировать ткани, удалять или коагулировать кожные новообразования, проводить лечение изменений и аномалий развития внутрикожных сосудов. При этом операции с использованием лазеров отличаются относительной простотой манипуляций, малотравматичностью, абластичностью, высокой избирательностью воздействия.

Электро- и радиохirurgические методики также широко применяются в дерматологии, прежде всего — при деструкции доброкачественных новообразований и осуществлении гемостаза. В последние годы данные технологии также используются и в эстетической медицине, с их помощью можно осуществлять шлифовку и термолифтинг кожи, корректировать деформированные рубцы и проводить другие косметологические процедуры.

Лазерные технологии в дерматологии и косметологии**Общие основы**

Теоретической основой современной лазерной дерматологии и косметологии стала предложенная в 1982 г. Андерсоном и Парришем концепция селективного фототермолиза, согласно которой выбор подходящей длины волны света, длительности и интенсив-

ности излучения позволяет осуществлять локальное прецизионное воздействие на поглощающие свет объекты (хромофоры), расположенные в глубине кожи, при этом нанося минимальный вред окружающим тканям. Авторами концепции было установлено, что эффективность воздействия определяется соотношением целевых и конкурирующих хромофоров ткани: чем выше это соотношение, тем более прицельно воздействие на патологические клетки.

Лазеры, используемые в медицине, генерируют излучение в видимой ($\lambda = 380-760$ нм), инфракрасной ($\lambda > 760$ нм), ультрафиолетовой ($\lambda < 380$ нм) и рентгеновской ($\lambda < 1$ нм) областях спектра электромагнитных волн. В зависимости от типа активной среды, используемой для генерации фотонов, различают следующие основные виды медицинских лазеров:

1. Газовые лазеры: CO₂-лазер, гелий-неоновый и аргонный лазеры — первые лазеры, излучающие непрерывный луч света.
2. Твердотельные лазеры, работающие в импульсном режиме: рубиновый, Nd:YAG (неодимовый лазер), Er:YAG (эрбиевый лазер), KTP (неодимовый лазер), александритовый и т.д.
3. Жидкостные лазеры на органических или неорганических красителях с очень короткими длительностями импульсов и продолжительными интервалами между каждым импульсом. Энергия лазерного излучения данных лазеров достаточно велика.
4. Лазеры на парах металлов (меди, золота).
5. Диодные лазеры (полупроводниковые).

Известно, что при взаимодействии лазерного света с тканью происходят следующие реакции:

- Фотостимуляция, для которой используются низкоинтенсивные терапевтические лазеры. Терапевтический лазер по энергетическим параметрам оказывает действие, не повреждающее биосистему, но в то же время его энергии оказывается достаточно для активации процессов жизнедеятельности организма, например, ускорения заживления ран.
- Фотодинамическая реакция, в основе которой лежит воздействие светом определенной длины волны на фотосенсибилизатор (естественный или

искусственно введенный), обеспечивающее цитотоксическое воздействие на патологическую ткань. В дерматологии фотодинамическое воздействие используется для лечения вульгарных угрей, псориаза, красного плоского лишая, витилиго, пигментной крапивницы и др.

- Фототермолиз и фотомеханические реакции, в результате которых при поглощении излучения происходит преобразование энергии лазерного луча в тепло на том участке кожи, который содержит хромофор. При достаточной мощности лазерного луча это приводит к тепловому разрушению мишени. Селективный фототермолиз можно применять для удаления пороков развития поверхностно расположенных сосудов, некоторых пигментных образований кожи, волос, татуировок [1].

Выраженный терапевтический эффект при лечении различных по этиологии и патогенезу заболеваний предполагает существование биостимулирующего механизма действия лазерного излучения небольшой мощности. В дерматологии и косметологии в настоящее время используется лазерное излучение двух типов: низкоинтенсивное и высокоинтенсивное.

Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) используется в основном для лазерной терапии кожных заболеваний. НИЛИ соответствует пределам мощности излучения от 0,1 до 100 мВт/см² и не вызывает видимых деструктивных изменений в тканях. Наиболее часто применяется НИЛИ красного и инфракрасного спектра, которые обладают большой проникающей способностью и достаточно физиологическим действием на ткани [2]. Действие НИЛИ заключается в активации ферментов мембран клеток, увеличении электрического заряда белков и фосфолипидов, стабилизации мембранных и свободных липидов, увеличении концентрации оксигемоглобина в организме, активации процессов тканевого дыхания, повышении синтеза цАМФ, стабилизации окислительного фосфорилирования липидов (снижении свободно-радикальных комплексов). При воздействии НИЛИ на биоткань наблюдаются противовоспалительный, антиоксидантный, обезболивающий и иммуномодулирующий эффекты.

На сегодняшний день НИЛИ с успехом применяется в дерматологии при лечении дерматозов, обусловленных нарушением пролиферации и дифференциации кератиноцитов, дерматитов, зудящих дерматозов, ангиитов, заболеваний соединительной ткани, заболеваний волос, нарушений пигментации, акне, розацеа, гнойно-воспалительных процессов [3].

Виды высокоинтенсивного лазерного вмешательства в дерматологии и косметологии могут быть условно подразделены на 2 типа: I тип — процедуры, в ходе которых проводят абляцию участка пораженной кожи, включая эпидермис; II тип — процедуры, избирательно нацеленные на ликвидацию патологических структур без повреждения целостности эпидермиса. Во втором случае ключевым условием процедуры является подбор характеристик лазера, излучение которого селективно поглощается в этих структурах, но не в эпидермисе, тогда как для вмешательств первого типа лазерное излучение более или менее одинаково поглощается всеми без исключения слоями кожи [4].

Высокоэнергетическое лазерное вмешательство I типа

Феномен абляции представляет собой одну из фундаментальных, интенсивно изучаемых, хотя еще и не до конца решенных проблем современной лазерной медицины. Применительно к лазерной хирургии под абляцией понимают ликвидацию участка живой ткани непосредственно под действием на нее фотонов лазерного излучения. При этом эффект проявляется именно в ходе самой процедуры облучения, когда облученный участок ткани после прекращения лазерного воздействия остается на месте, а его постепенная ликвидация наступает позднее в результате серии местных биологических реакций, развивающихся в зоне облучения. Механизм и параметры (энергетические характеристики, производительность) абляции определяются свойствами облучаемого объекта (соотношением жидкого и плотного компонентов, их химических и физических свойств, характером внутри- и межмолекулярных связей, термической чувствительностью клеток и макромолекул, кровоснабжением ткани и т.д.), характеристикой излучения (длина волны, непрерывный или импульсный режим облучения, мощность, энергия в импульсе, суммарная поглощенная энергия и т.д.), а также параметрами, неразрывно связывающими свойства объекта и лазерного луча, — коэффициентами отражения, поглощения и рассеяния данного вида излучения в данном виде ткани или ее отдельных составляющих. Для абляционных методик используются СО₂-лазеры ($\lambda = 10600$ нм) и эрбиевые лазеры ($\lambda = 2940$ нм). Поскольку излучение с такими длинами волн очень хорошо поглощается водой, то оно взаимодействует даже с тем небольшим количеством воды (10–15 %), которое содержится в эпидермисе.

Область применения СО₂-лазера очень обширна. В фокусированном режиме он используется для иссечения тканей с одновременной коагуляцией сосудов. В дефокусированном режиме за счет уменьшения плотности мощности производится послойное удаление (вапоризация) патологической ткани. Именно таким способом ликвидируют поверхностные злокачественные и потенциально злокачественные опухоли (базальноклеточную карциному, актинический хейлит, эритроплазию Кейра), ряд доброкачественных новообразований кожных покровов (ангиофибром, сириному, трихоэпителиому и др.), крупные послеожоговые струпы, воспалительные кожные заболевания (гранулемы, узелковый хондродерматит ушной раковины), кисты, инфекционные поражения кожи (бородавки, рецидивирующие кондиломы, глубокие микозы), сосудистые поражения (пиогенную гранулему, ангиокартому, кольцевидную лимфангиому), образования, обуславливающие косметические дефекты (ринофиму, глубокие постугревые рубцы, эпидермальные родимые пятна, лентиги, ксантелазму) и др.

Многочисленные исследования показали, что использование абляционного воздействия СО₂-лазером для омоложения кожи, удаления шрамов, рубцов, возрастной пигментации, признаков выраженного фотостарения (при традиционной лазерной обработке) дает хорошие и прогнозируемые результаты [5–7]. Однако такое лечение зачастую связано с побочными эффектами — длительным временем реабилитации, эрите-

мой (в среднем 4,5–9,0 мес), инфекциями различного генеза, временными и постоянными дисхромиями (гипер- и гипопигментациями), рубцеванием. Особенно проблематичной является гипопигментация, которая может проявиться через 1 год после лечения и стать необратимой, что потребует снижения длительности или количества проводимых процедур, и, в свою очередь, приведет к недостаточным клиническим результатам [8].

Эрбиевый лазер для абляционной лазерной обработки стал использоваться как альтернатива углекислотному лазеру. После его воздействия происходит более быстрое заживление, однако данное излучение имеет меньшую глубину оптического проникновения и, соответственно, меньшую зону абляции и коагуляции по сравнению с CO_2 -лазером, что приводит к снижению эффективности процедуры [9–11].

Высокоэнергетическое лазерное вмешательство II типа

К неабляционным относятся процедуры, в ходе которых добиваются лазерного повреждения определенных внутридермальных и подкожных образований без нарушения целостности кожного покрова. Эта цель достигается подбором характеристик лазера — длины волны и режима облучения, которые должны обеспечить поглощение лазерного света хромофором (окрашенной структурой-мишенью), что приводит к его разрушению или обесцвечиванию за счет превращения энергии излучения в тепловую (фото-термолиз), а в некоторых случаях и в механическую энергию. Важнейшими эндогенными хромофорами являются меланин, гемоглобин, вода и коллаген, в связи с чем данные процедуры широко применяются в лечении сосудистых патологий кожи, коррекции гиперпигментации и возрастных изменений, удалении волос. Меланин в норме содержится в эпидермисе и волосных фолликулах. Спектр его поглощения лежит в диапазоне ультрафиолета (УФ) и видимого света, а ослабление поглощения наступает в ближней инфракрасной области. Максимумы поглощения гемоглобина находятся в области УФ-А (320–400 нм), синих (400 нм), зеленых (541 нм) и желтых (577 нм) волн. К спектру поглощения коллагена относятся область видимого света и ближней инфракрасной части спектра. Взаимодействие с водой происходит в средней и дальней инфракрасной области спектра. К экзогенным хромофорам относятся чернила для татуировок, а также частицы грязи, импрегнированные при травме.

Концептуальные положения клинического использования высокоинтенсивного лазерного излучения II типа отражены в теории селективного фототермолиза (Андерсон и Пэрриш, 1983):

1. Тканевые хромофоры, такие, как меланин и гемоглобин, поглощают свет тем интенсивнее, чем короче длина волны излучения.
2. Эффективность поглощения лазерного излучения в глубоких слоях кожи растет с увеличением длины волны — чем больше длина волны, тем глубже проникает излучение.
3. Чем меньше размеры мишени, тем короче должен быть импульс излучения.

4. При слишком коротком импульсе раньше разогрева мишени происходит ее разрушение из-за ударных волн, обусловленных генерацией плазмы и оптическим пробоем.

Идеальным селективным воздействием можно считать такое воздействие, при котором лучи лазера поглощаются только структурами мишени, а за ее пределами поглощение отсутствует. Для достижения такого результата специалисту, выбравшему лазер с соответствующей длиной волны, необходимо установить плотность энергии излучения и продолжительность экспозиций (или импульсов), а также интервалов между ними. Эти параметры определяют с учетом времени термической релаксации (ВТР) для данной мишени — промежутка времени, за который возросшая в момент подачи импульса температура мишени опускается на половину ее прироста по отношению к исходной. Превышение длительности импульса над значением ВТР вызывает нежелательный перегрев ткани вокруг мишени; к такому же эффекту приводит и уменьшение интервала между импульсами. В принципе, все эти условия могут быть смоделированы математически перед операцией, однако сам состав кожи не позволяет в полной мере воспользоваться расчетными данными, так как в базальном слое эпидермиса находятся меланоциты и отдельные кератиноциты, которые содержат меланин. Так как этот пигмент интенсивно поглощает свет в видимой, а также близких к ней ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра («оптическое окно» меланина находится в пределах от 500 до 1100 нм), то любое лазерное излучение в данном диапазоне будет поглощаться меланином, что может привести к термическому повреждению и гибели соответствующих клеток. Более того, излучение в видимой части спектра поглощается также цитохромами и флавиновыми ферментами (флавопротеидами) как меланинсодержащих клеток, так и всех остальных типов клеток эпидермиса и дермы. Из этого следует, что при лазерном облучении мишени, расположенной под поверхностью кожи, некоторое повреждение эпидермальных клеток становится неизбежным. Поэтому реальная клиническая задача сводится к компромиссному поиску таких режимов лазерного облучения, при которых стало бы возможным достигать максимального поражения мишени при наименьшем повреждении эпидермиса (с расчетом на его последующую регенерацию, главным образом, за счет соседних необлученных участков кожи). Соблюдение всех этих условий применительно к конкретной мишени приведет к ее максимальному повреждению (разогреву или распаду) при минимальном перегреве или механической травме соседних структур.

В настоящее время лазерные вмешательства II типа применяются при:

- Лечении сосудистой патологии кожи: врожденных аномалий сосудов («винные пятна», гемангиомы, «венозные озера»), сенильных гемангиом, телеангиэктазий, патологии вен нижних конечностей. Для этих целей используются импульсные лазеры на красителях (585, 595 нм), калий-титанил-фосфатные (532 нм) и неодимовые (1064 нм) лазеры, длины волн которых обеспечивают селективное поглощение оксигемоглобином.

- Лечение доброкачественных пигментных новообразований и удалении татуировок. Используются в основном лазеры, работающие в Q-switch режиме, или с модуляцией добротности. Q-switch — электронно-оптическое устройство, используемое для генерации импульсов длительностью несколько наносекунд. Наносекундные вспышки света могут фрагментировать и распылять меланин и татуажные чернила, изменяя их оптические свойства. Осветление достигается за счет постепенного захвата фрагментированных частичек активированными макрофагами и удаления их по лимфатическим сосудам. При лечении поверхностных пигментных поражений кожи (веснушки, пятна цвета кофе с молоком, лентиго) чаще используют рубиновый лазер с модуляцией добротности (694 нм). Для удаления красителя татуировок применяют рубиновый и александритовый (755 нм) лазеры с модуляцией добротности, которые лучше подходят для выведения зеленых чернил. Красные пигменты лучше поддаются воздействию зеленого света, удвоенного по частоте, испускаемого неодимовым лазером (532 нм), который также эффективен при сине-черных татуировках.
- Удалении нежелательных волос. В данном случае для лазерного света мишенью, скорее всего, служат стволовые клетки и кровеносные сосуды сосочка, а поглощающим хромофором является меланин волосяного стержня. Излучение спектра 600–1200 нм поглощается меланином и глубже проникает в дерму при увеличении длины волны. Для этих целей используются обычные (без модуляции добротности) лазеры — рубиновый (694 нм), александритовый (755 нм), полупроводниковый (800 нм) и неодимовый (1064 нм) с мощностью потока 20–60 Дж/см² [1].

Фракционный лазерный фототермолиз

Так как поиск малоинвазивных методов лечения с минимальными побочными эффектами и высокой эффективностью всегда являлся приоритетным в косметологии, то разработка в 2004 г. D. Manstein et al. новой технологии омоложения и лечения кожи, названная фракционным лазерным фототермолизом (ФЛФ), безусловно, стала одним из ключевых этапов развития эстетической медицины [12]. Данный метод заключается в создании несообщающихся микротермических зон (МТЗ) повреждения определенных размеров, окруженных зонами неповрежденной ткани. Путем сохранения таких зон неповрежденной ткани целостность эпителия восстанавливается за счет его быстрой реэпителизации, что значительно сокращает время заживления и приводит к полному восстановлению ткани без рубцевания и побочных эффектов воздействия [13].

В настоящее время в практике дерматовенерологов и косметологов используется как абляционный, так и неабляционный ФЛФ.

Внедрение фракционных абляционных методов лечения позволило сократить время реабилитации и число побочных эффектов (по сравнению с традиционной абляционной лазерной шлифовкой кожи) при сохранении высокой эффективности процедуры.

Первый опыт применения абляционного фракционного фотоомоложения с использованием устройства на основе CO₂-лазера был описан в 2007 г. В.М. Hantash et al [14]. Метод заключается в создании сетки из микротермальных зон повреждения настраиваемой плотности и глубины. При этом абляция и коагуляция дермы и эпидермиса, включая роговой слой, происходят только в пределах МТЗ, а устойчивое ремоделирование коллагена наблюдается в течение 3 мес после воздействия [15].

Абляционный ФЛФ показал большой потенциал при лечении серьезных косметических дефектов — глубоких морщин и рубцов различного происхождения. В ходе оценки клинической эффективности абляционной фракционной обработки кожи CO₂-лазером ($\lambda = 10600$ нм) и Er:YAG-лазером ($\lambda = 2940$ нм) было установлено, что подобный режим способствует уменьшению глубины морщин умеренной и тяжелой степени тяжести, нивелирует дисхромии и сравним по эффективности с традиционной абляционной шлифовкой [16]. Исследователями было показано уменьшение глубины морщин на 20 % после однократной фракционной обработки как CO₂-, так и Er:YAG-лазером. Установлено статистически значимое уменьшение степени тяжести морщин, которое наступило через 3 мес после абляционной фракционной обработки эрбиевыми лазерами с длиной волны как 2790 нм, так и 2940 нм [17].

В настоящее время абляционный ФЛФ широко применяется для коррекции рубцов различного происхождения, а обработка CO₂-лазером является «золотым стандартом» для таких задач. Процедура абляционного ФЛФ CO₂-лазером в 26–50 % случаев значительно улучшает состояние рубцов разной степени тяжести, а общее улучшение состояния кожи достигается у всех пациентов [18]. При этом доказано, что традиционная лазерная шлифовка приводит к более длительному восстановительному периоду после процедуры и развитию более значительных побочных эффектов по сравнению с абляционным ФЛФ [19].

Хотя многие исследования показали преимущества неабляционного ФЛФ, заключающиеся в минимальном развитии побочных эффектов и меньшем времени заживления, следует учитывать, что данная технология оказывается менее эффективной, чем абляционная лазерная шлифовка Er:YAG-лазерами, даже в случае проведения нескольких сеансов лечения. Проведение абляционной фракционной лазерной обработки позволяет достичь уменьшения времени восстановления после процедуры (по сравнению с классической обработкой), а также снизить риск возникновения дополнительных рубцов и пигментных нарушений.

Неабляционный ФЛФ является эффективным методом разглаживания морщин, лифтинга (подтягивания) кожи, омоложения, общего улучшения состояния кожи, лечения нарушений пигментации и атрофических рубцов. Этот метод применяется в тех случаях, когда планируется заметный результат без интенсивного воздействия и длительного реабилитационного периода [16], например, для лечения различных пигментных нарушений кожи, связанных либо с недостаточным, либо с избыточным синтезом меланина.

В зарубежных исследованиях была продемонстрирована эффективность метода в терапии спонтанного гипомеланоза с использованием эрбиевого лазера с длиной волны 1550 нм: после двух обработок отмечалось статистически значимое отличие результатов воздействия в группе исследования и группе контроля, при этом восстановление нормального цвета кожи возрастало через 4 нед [20].

В работе L. Bencini et al было установлено, что при использовании неабляционного ФЛФ эрбиевым лазером с длиной волны 1540 нм для обработки рубцов постакине происходило снижение их степени тяжести. Через 6 мес после окончания лечения заметное улучшение наблюдалось у 98 % пациентов со II степенью тяжести и у 83 % пациентов с III степенью тяжести рубцов [21].

В ряде работ была проведена оценка частоты и длительности возникающих побочных эффектов при неабляционной обработке. Так, в исследовании S.M. Lee et al было показано, что при использовании эрбиевого лазера с длиной волны 1550 нм и туллиевого лазера с длиной волны 1927 нм для неабляционного фракционного воздействия нежелательные побочные эффекты после процедуры возникали лишь у 5 % пациентов, из них наиболее часто регистрировались эритема (1,8 %), поствоспалительная гиперпигментация (1,1 %), увеличение меланодермии (0,9 %); наиболее редко — простой герпес (0,6 %) и угревая сыпь (0,2 %) [22].

Приведенные данные позволяют утверждать, что неабляционная фракционная лазерная обработка является эффективным методом лечения атрофических рубцов (стрий, рубцов постакине) и нарушений пигментации, применима для общего улучшения состояния кожи, характеризуется минимальным количеством побочных явлений и долгосрочным эффектом.

Радиохирургические методы

Радиохирургические технологии являются разновидностью современной электрохирургии, при этом термин «радиохирургия» относится к двум различным методам. Первый из них — стереотаксическая лучевая терапия — медицинская процедура неинвазивного лечения доброкачественных и злокачественных образований, а также сосудистых мальформаций с помощью направленных пучков ионизирующего излучения. Эта форма радиохирургии была разработана в Швеции в 1949 г. для облучения опухолей головного мозга (Гамма-нож). Второй тип радиохирургии (радиочастотная или радиоволновая хирургия) представляет собой метод, позволяющий проводить разрезание, коагуляцию, диссекцию и фульгурацию тканей с использованием высокочастотного переменного тока [23, 24].

С помощью традиционных электрохирургических устройств (электрокоагуляторов) рассечение и коагуляция происходят за счет нагрева ткани и наконечника электрода, пропускающих электрический ток, при этом для получения тех или иных эффектов воздействия необходимо давление оператора на ручку-манипулятор с электродом. Как известно, кожа может оказывать значительное сопротивление электрическому току, соответственно, в ходе процедуры происходит высокотемпературный нагрев наконечника электрода и чрезмерный нагрев окружающих тканей с

их термическим повреждением. Соответственно, при использовании методов электрохирургии толщина скоагулированных тканей может быть значительной и, как следствие, заживление ран нередко происходит с образованием эстетических дефектов в виде рубцов, а период эпителизации значительно увеличивается. Кроме того, при выполнении манипуляций на электрохирургических аппаратах пациент «замыкается в цепь», в связи с чем существует потенциальный риск получения электротравмы или ожога в области нейтрального электрода — резиновой пластины, которая плотно прикладывается к коже пациента в зоне ягодиц или заднебоковой поверхности бедра (где толщина мягких тканей максимальна, отсутствуют костные выступы, нет обильного скопления потовых желез). При монополярном режиме электрический ток проходит через тело пациента от активного (оперативного) электрода к пластинке возвратного (нейтрального) электрода и таким образом электрическая цепь замыкается [25, 26].

В настоящее время существуют аппараты, в которых используется ток высокой частоты (радиочастоты) и схема передачи энергии через нейтральный электрод. У таких аппаратов нежелательные явления воздействия на ткань сведены к минимуму, однако эффекты рассечения и коагуляционные свойства более грубые по сравнению с радиоволновыми аппаратами (например, «Сургитроном ЕМС»), что в значительной мере влияет на эстетический результат и скорость заживления ран [27].

Принцип радиочастотной или радиоволновой хирургии состоит в том, что передача энергии происходит от электрода-излучателя к антенне без замыкания пациента в электрическую цепь. Антенна не требует контакта с кожей, достаточно как можно ближе расположить приемную пластину к месту выполнения манипуляции. Таким образом создается электромагнитное поле, в рамках которого ручка с электродом (излучателем) позволяет рассекать и/или коагулировать ткань за счет воздействия на молекулы воды в клетках тканей с меньшим их нагревом по сравнению с аппаратами с нейтральным электродом. Радиоволна, передаваемая активным электродом, вызывает локальный нагрев воды в клетках (кипение или коагуляцию в зависимости от формы волны). Наиболее подходящим диапазоном для работы с тканями является радиоволны с частотой 3,8–4,0 МГц. Эта частота позволяет мгновенно получить эффекты разрезания или коагуляции ткани без лишнего нагрева ткани и электродов. Основной отличительной особенностью применения радиохирургии по сравнению с электрокоагуляторами и стальным скальпелем является отсутствие выраженного ручного давления при рассечении ткани. Это связано с биологическими эффектами воздействия на ткань, которые возникают во время процедуры: исходя из генератора через активный электрод, энергия направляется к пассивному электроду (антенне), встречает сопротивление клеток и мгновенно их разогревает. Переход радиоволнового излучения в тепловое происходит за счет молекул воды в клетках и тканях, в результате чего внутриклеточная жидкость вскипает и разрывает клеточную мембрану. При вскипании образуются мелкие пузырьки пара, которые раздвигают

ткани перед радиоволной (рис. 1). Поэтому характерной особенностью радиоволновых аппаратов является бесконтактный способ работы на минимально возможном расстоянии от ткани с меньшим тепловым повреждением окружающих тканей. Быстрый (мгновенный) нагрев молекул воды сопровождается рассеиванием ткани, медленный — эффектами коагуляции [28–32].

Режимы радиоволнового воздействия на ткань

CUT (разрез). В этом режиме аппарат генерирует полностью выпрямленную и фильтрованную форму радиоволны, которая представляет собой непрерывный поток высокочастотных колебаний, производящий тончайший, идеально ровный разрез. Такая волна обеспечивает наименьший поперечный нагрев и наименьшее разрушение ткани: 90 % радиоволновой энергии расходуется на разрез и 10 % — на коагуляцию. Это позволяет удалять доброкачественные новообразования эпителиального происхождения без использования дополнительной коагуляции или перехода в режим COAG (коагуляции). Рассечение тканей происходит легко и быстро, при этом мельчайшие кровеносные сосуды коагулируются, что позволяет получить чистый сухой разрез с очень тонкой коагуляционной пленкой или без нее, обеспечивает короткие сроки реабилитации и отличный эстетический результат (рис. 2).

BLEND (смесь) или CUT/COAG (разрез и коагуляция). Полностью выпрямленная форма волны представляет собой радиоволну слабой пульсации, производящую разрез с легкой поверхностной коагуляцией (без обугливания), так называемой коагуляционной пленкой, на разрезах тканей. Такая коагуляция эффективно останавливает кровотечение и запаивает нервные волокна, что позволяет выполнять «сухие» разрезы и снижает болезненность в послеоперационном периоде: 50 % радиоволновой энергии расходуется на разрез и 50 % — на коагуляцию. Данный режим работы необходим при выполнении эксцизий и конизаций шейки матки, при выполнении глубоких разрезов мягких тканей, при удалении обильно васкуляризированных образований. В дерматологической практике данный режим незаменим при работе с кондиломами на слизистых оболочках и переходных зонах около слизистых оболочек (рис. 3).

COAG или НЕМО (коагуляция). Частично выпрямленная форма волны представляет собой пульсирующий поток высокочастотных колебаний: 90 % радиоволновой энергии расходуется на коагуляцию и 10 % — на разрез. Радиоволновая коагуляция отличается от электрокоагуляции отсутствием обугливания тканей и образования ожогового струпа. Во время радиоволновой коагуляции образуется фибринная пленка белесого цвета, которая запаивает ткани, препятствует кровотечению, защищает их от вторичной инфекции и снижает болезненность в послеоперационном периоде. В зависимости от времени воздействия, установленной мощности, площади обрабатываемой поверхности и диаметра электрода, данный режим позволяет провести мгновенную или медленную, глубокую или очень тонкую коагуляцию. Также возможно выполнение манипуляции в нескольких



Рис. 1. Принцип работы радиоволновых аппаратов
Fig. 1. Principle of operation of radio-wave devices

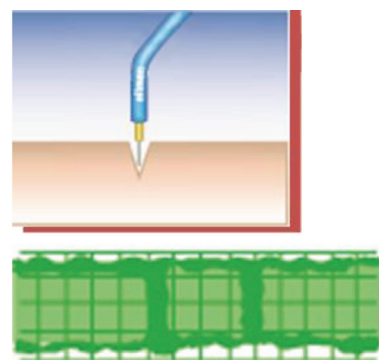


Рис. 2. Режим воздействия на ткань — чистый разрез и тонкая коагуляционная пленка

Fig. 2. Mode of exposure to the tissue — a clean incision and a thin coagulation film

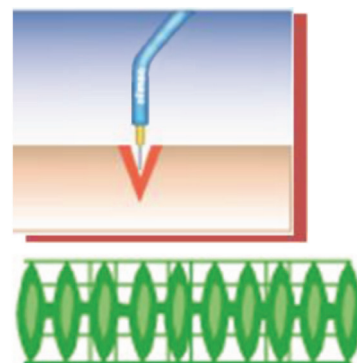


Рис. 3. Режим воздействия на ткань — легкий разрез и достаточная коагуляция

Fig. 3. Mode effects on fabric — easy enough cut and coagulation

вариантах: прямая коагуляция выполняется электродом, едва касающимся поверхности ткани, а косвенная — посредством прикосновения к хирургическим инструментам (зажиму и т.п.).

BIPOLAR (биполярная коагуляция). Используется для коагуляции сосудов (диаметром до 2,0 мм) в сухом или влажном операционном поле путем непосредственного контакта специального электрода с тканью. Данный режим удобно использовать при необходимости быстрой остановки кровотечения из поврежден-

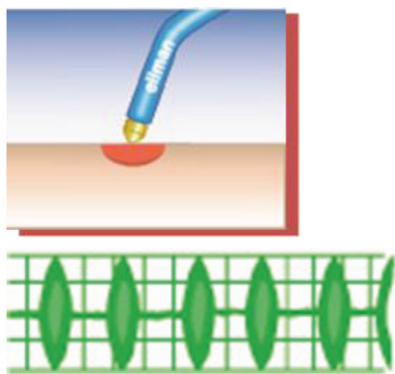


Рис. 4. Режим воздействия на ткань — полностью контролируемая коагуляция

Fig. 4. Tissue exposure Mode — fully controlled coagulation

ного сосуда, а использование отдельного наконечника со своим разъемом и отдельным входом позволяет не тратить время на смену электродов (рис. 4).

FULGURATE (фульгурация) — искровое воздействие на ткань. При работе в данном режиме электрод не касается ткани, происходит коагуляция, карбонизация и сморщивание тканей. Режим предназначен для работы с сухими дегидратированными образованиями, для коагуляции раны, когда не представляется возможным осушить основание и выполнить точечную коагуляцию. Данный режим достаточно жесткий и может приводить к негативным косметическим последствиям при работе с кожей.

Все эти режимы могут применяться последовательно в ходе одного и того же вмешательства или использоваться как самостоятельные методики.

Радиоволновые методы с плазменными источниками

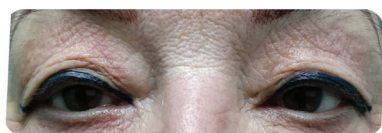
В последние годы радиоволновые технологии также используются в эстетической медицине. Так, широкое распространение в настоящее время получила процедура безоперационной блефаропластики, заключающаяся в проведении очень поверхностной точечной абляции эпидермиса век и избытка кожной складки верхнего века игольчатым электродом путем нанесения точек абляции в режиме CUT на минимально возможной мощности, выбранной с учетом типа кожи, ее толщины и уровня гидратации. Расстояние между точками абляции при этом составляет 1–3 мм, анатомическая область обрабатывается частично или полностью, что позволяет тканям достаточно быстро восстанавливаться. При работе с рубцами в этой же технике отличных результатов возможно добиться при обработке поверхности, в 3–5 раз превышающей площадь рубцового дефекта. Однако эффективность и безопасность данной процедуры в значительной степени зависит от опыта и навыков специалиста, и ошибки в ее выполнении могут привести к серьезным эстетическим дефектам (рубцам, пятнам гипопигментации, гиперпигментации, истончению кожи, стойкой постпроцедурной гиперемии).

В 2018 г. специалистам был представлен радиоволновой аппарат ЭХВЧ-35-МЕДСИ PLASMA RFL с частотой 2 640 кГц, позволяющий генерировать плазменные разряды. Последние разработки в области

плазменных источников дают возможность генерировать плазму комнатной температуры на «открытом воздухе» и применять ее *in vivo*. Разряд плазмы генерируется в наконечнике электрода под действием тока высокой частоты; в качестве рабочего тела используется атмосферный воздух, разряд передается в кожу, как в точку наименьшего сопротивления. Мощность и частота разрядов регулируются настройками аппарата. Способ передачи плазмы является бесконтактным, а электрод располагается на расстоянии 3–4 мм от поверхности кожи.

В ходе процедуры плазменный пучок запускает специфические реакции в биологических тканях, в частности, ускоряет пролиферацию клеток, усиливает окислительный стресс, а также обладает выраженным бактерицидным действием [33]. Присутствующий в плазме химически инертный азот подавляет горение тканей, вытесняя из них кислород, требуемый для процесса окисления. В результате воздействия плазмы слои кожи повреждаются очень поверхностно, а не сгорают, как под воздействием аблятивных лазеров, электрокоагуляторов, в связи с чем не образуется открытых ран. Такое воздействие плазменным потоком сокращает риск побочных эффектов в виде шрамов, инфекций и депигментаций. При точечном воздействии, если температура пучка достигла 60 °С, в месте контакта могут появляться белки теплового шока и проходить каскад связанных с ними реакций, при этом нагрев носит не критический характер, и видимых повреждений в виде карбонизации или обугливания ткани не происходит [34]. Воздействие плазмы, сопровождающееся выделением монооксида азота, приводит к появлению так называемого точечного «фроста» — тонкой коагуляционной пленки на поверхности эпидермиса, в диаметре не превышающей 1 мм. Данное специфическое воздействие плазмы позволяет выполнять ряд косметологических процедур (поверхностный пилинг, удаление рубцов, морщин, поверхностного или глубокорасположенного пигмента, эпидермальных новообразований кожи небольшого размера, ликвидацию небольшого избытка ткани век), улучшает эластичность тканей и тургор кожи, способствует более быстрому заживлению воспалительных элементов при акне и т.д. В последние годы появляются сообщения об успешном применении постоянного атмосферного факела плазмы при меланоме, базально-клеточном и плоскоклеточном раке кожи.

Перечень показаний для использования плазмы в дерматовенерологии и косметологии постоянно пополняется, при этом сообщения о результатах терапии нередко появляются раньше, чем научное обоснование эффектов воздействия. Большинство видов воздействия для обновления кожи основаны на принципе ее контролируемого повреждения, провоцирующего процесс регенерации. В настоящее время механизм воздействия смеси плазменного пучка атмосферного воздуха, представляющего низкоионизированную, сложную смесь положительно и отрицательно заряженных частиц, окончательно не ясен. Однако новый перспективный метод уже продемонстрировал отличные результаты в процедуре безоперационной блефаропластики. Реабилитация после обработки век продолжается не более 5–7 сут, что значительно короче по



До процедуры

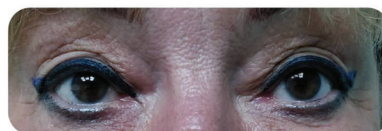
Через 1 мес
после процедуры

Рис. 5. Результаты проведения безоперационной блефаропластики с использованием радиоволновой технологии

Fig. 5. Results of non-surgical blepharoplasty using radiowave technology

сравнению с другими методами, при этом негативные эффекты, перечисленные выше, отсутствуют, однако

эффективность и безопасность применения данного метода также в значительной степени зависят от навыков и умения специалистов, выполняющих процедуру (рис. 5).

Заключение

На сегодняшний день лазерные и радиоволновые технологии представляют собой отдельное направление в дерматологии и эстетической медицине. Преимуществами методов являются многофункциональность, минимальное повреждение тканей, ускорение процессов регенерации тканей, низкая болезненность послеоперационных элементов, высочайший косметический эффект. При этом разнообразие аппаратуры и методик определяет необходимость понимания механизмов взаимодействия лазерного излучения и радиоволнового воздействия с биологическими тканями, знания технологии воздействия и показаний применения с учетом глубины и объёмов повреждения, что требует высокой квалификации специалистов.

Laser and Radiowave Technologies in Dermatovenereology and Cosmetology

E.V. Lipova, M.R. Rakhmatulina, I.I. Glazko, A.S. Chekmarev

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

E-mail: ra.marg@yandex.ru

ABSTRACT

The article presents current data on the use of laser and radio-wave techniques in dermatology and cosmetology. Types of lasers, reactions of interaction of laser light with skin are characterized, the detailed characteristic of low-intensity and high-intensity laser radiation and opportunities of their application in dermatology and cosmetology is given. Ablative and non-ablative methods of skin exposure, the principle of fractional laser photothermolysis are described. The method of radiowave influence on tissues and its modes is presented. The principles of radiowave surgery and the possibility of using radiowave techniques in the treatment of skin tumors and aesthetic cosmetology are discussed. The data on the use of plasma RFL regime for plasma skin rejuvenation are described.

Key words: laser technology, photothermolysis, electrosurgical methods, radio wave, dermatosis, cosmetology, plasma RFL

For citation: Lipova EV, Rakhmatulina MR, Glazko II, Chekmarev AS. Laser and Radiowave Technologies in Dermatovenereology and Cosmetology. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):68-76 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-68-76

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шептий ОВ, Круглова ЛС, Корчажкина НБ и др. Механизмы действия различных лазеров и дифференцированные показания к их применению (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. 2014. № 1. <https://elibrary.ru/item.asp?id=22988231> <https://doi.org/10.12737/5812> (дата обращения 20.09.2019) [Sheptiy OV, Kruglova LS, Korchazhnikina NB, Kotenko KV, Yamenskov VV. Action mechanisms of various lasers and the differentiated indications to their application (review). Bulletin of New Medical Technologies. Electronic journal. 2014;1. Russian. Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=22988231> <https://doi.org/10.12737/5812> (In Russ.)].
2. Потекаев НН, Круглова ЛС. Лазер в дерматологии и косметологии. М.: МДВ. 2012. 280 с. [Potekaev NN, Kruglova LS. Laser in dermatology and cosmetology. Moscow; 2012. 280 p. (In Russ.)].
3. Утс СР, Волнухин ВА. Низкоинтенсивная лазерная терапия в дерматологии. Саратов: Изд-во Саратовского университета. 1998. 93 с. [Uts SR, Volnuhin VA. Low-intensity laser therapy in dermatology. Saratov; 1998. 93 p. (In Russ.)].
4. Шахно ЕА. Физические основы применения лазеров в медицине. СПб: НИУ ИТМО. 2012. 129 с. [Shahno EA. Physical bases of laser application in medicine. Saint Petersburg; 2012. 129 p. (In Russ.)].
5. Schwartz RJ, Burns AJ, Rohrich RJ, Barton FE, Byrd HS. Long-term assessment of CO₂ facial laser resurfacing: aesthetic results and complications. Plast Reconstr Surg. 1999;103(2):592-601. DOI: 10.1097/00006534-199902000-00037
6. Weinstein C. Carbon dioxide laser resurfacing: long-term follow up in 2,123 patients. Clin Plast Surg. 1998;25(1):109-30. DOI: 10.1016/s0278-2391(98)90789-3
7. Xu Y, Deng Y. Ablative Fractional CO₂ laser for facial atrophic acne scars. Facial Plastic Surg. 2018;34(2):205-19.
8. Li D, Lin SB, Cheng B. Complication and posttreatment care following invasive laser skin resurfacing: a review. J Cosmet Laser Ther. 2018;20(3):168-78. DOI: 10.1080/14764172.2017.1400166.
9. Alexiades-Armenakas MR, Dover JS, Arndt KA. The spectrum of laser skin resurfacing: nonablative, fractional, and ablative laser resurfacing. J Am Acad Dermatol. 2008;58(5):719-40. DOI: 10.1016/j.jaad.2008.01.003.

10. Goldman MP, Fitzpatrick RE, Ross V, Kilmer SL, Weiss RA. (editors). Lasers and energy devices for the skin. CRC Press; 2013. 381 p.
11. Goldman MP, Marchell N, Fitzpatrick RE. Laser skin resurfacing of the face with a combined CO₂/Er:YAG laser. *Dermatol Surg.* 2000;26(2):102-4. DOI: 10.1046/j.1524-4725.2000.98208.x.
12. Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med.* 2004;34(5):426-438. DOI: 10.1002/lsm.20048.
13. Wanner M, Tanzi EL, Alster TS. Fractional photothermolysis: treatment of facial and nonfacial cutaneous photodamage with a 1,550-nm erbium-doped fiber laser. *Dermatol Surg.* 2007;33(1):23-28. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2007.33003.x.
14. Laubach HJ, Tannous Z, Anderson RR, Manstein D. Skin responses to fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med.* 2006;38(2):142-9. DOI: 10.1002/lsm.20254.
15. Hantash BM, Bedi VP, Kapadia B, Rahman Z, Jiang K, Tanner H, et al. *In vivo* histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med.* 2007;39(2):96-107. DOI: 10.1002/lsm.20468.
16. Tierney EP, Kouba DJ, Hanke CW. Review of fractional photothermolysis: treatment indications and efficacy. *Dermatol Surg.* 2009;35(10):1445-61. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2009.01258.x.
17. Karsai S, Czarnecka A, Jünger M, Raulin C. Ablative fractional lasers (CO and Er:YAG): a randomized controlled double-blind split-face trial of the treatment of peri-orbital rhytides. *Lasers Surg Med.* 2010;42(2):160-7. DOI: 10.1002/lsm.20879.
18. Chapas AM, Brightman L, Sukal S, Hale E, Daniel D, Bernstein LJ et al. Successful treatment of acneiform scarring with CO ablative fractional resurfacing. *Lasers Surg Med.* 2008;40(6):381-386. DOI: 10.1002/lsm.20659.
19. Yang YJ, Lee GY. Treatment of striae distensae with nonablative fractional laser versus ablative CO fractional laser: a randomized controlled trial. *Ann Dermatol.* 2011;23(4):481-9. DOI: 10.5021/ad.2011.23.4.481.
20. Rerknimitr P, Chitvanich S, Pongprutthiphan M, Panchaprateep R, Asawanonda P. Non-ablative fractional photothermolysis in treatment of idiopathic guttate hypomelanosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(11):2238-42. DOI: 10.1111/jdv.12763.
21. Bencini PL, Tournalaki A, Galimberti M, Longo C, Pellacani G, De Giorgi V, et al. Nonablative fractional photothermolysis for acne scars: clinical and *in vivo* microscopic documentation of treatment efficacy. *Dermatol Ther.* 2012;25(5):463-7. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2012.01478.x.
22. Lee SM, Kim MS, Kim YJ, Won CH, Lee MW, Choi JH. et al. Adverse events of non-ablative fractional laser photothermolysis: a retrospective study of 856 treatments in 362 patients. *J Dermatolog Treat.* 2014;25(4):304-7. DOI: 10.3109/09546634.2013.777151.
23. Энгел ОТ, Назаренко АВ. История развития стереотаксической радиохирургии и ее роль в лечении метастазов в головной мозг. Опухоли головы и шеи. 2015;5(1):27-35. [Engel OT, Nazarenko AV. History of stereotactic radio-surgery and its role in the treatment of brain metastases. *Head and Neck Tumors.* 2015;5(1):27-35. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2222-1468-2015-1-27-35.
24. Rausa PPM, Verhaert PDEM. Radiofrequency surgery: 3500 years old and still young. *Orbit.* 2018;37(3):159-64. DOI: 10.1080/01676830.2017.1383469.
25. Ахтямов СН. Электро- и радиохирургические методы в дерматологии и косметологии. Методическое пособие. 2014. 67 с. [Ahtyamov SN. Electro-and radiosurgical methods in dermatology and cosmetology. Methodical manual. 2014, 67 p. Available from: <http://www.mtucimed.ru/files/Ahtyamov.pdf> (In Russ.)].
26. Бутов ЮС, Ахтямов СН, Демина ОМ. и др. Возможности электрохирургии в дерматокосметологии. Регулярные выпуски «РМЖ». 2009;17:1064. [Butov YS, Ahtyamov SN, Demina OM, Melkonov YV, Terekhov SV, Gureev KV. The possibility of surgery in dermatology. Regular editions of «RMJ». 2009;17:1064. (In Russ.)].
27. Труфанов ВД. Клинико-экспериментальное обоснование применения радиоволнового скальпеля при операциях на лице и в полости рта. М.: Автореф. дисс. канд. мед. наук. 2017. 27 с. [Trufanov VD. Clinical and experimental substantiation of the use of radiowave scalpel in facial and oral surgeries. Moscow. 2017, 27 p. Available from: https://www.sechenov.ru/upload/medialibrary/e84/06.02_avtoreferat_trufanova_v_d.pdf (In Russ.)].
28. Лапкин КВ. Первый опыт применения аппарата Сургитрон в хирургии органов билиопанкреатодуоденальной зоны. Актуальные вопросы хирургической патологии. Томск. 1997. 159 с. [Lapkin KV. The first experience of use of the device Surgitron surgical authorities biliopancreatoduodenal zone. Topical issues of surgical pathology. Tomsk. 1997, 159 p. (In Russ.)].
29. Brown JS, Smith RR, Cantor T, Chesover D, Yearsley R. General practitioners as providers of minor surgery — a success story. *Br J Gen Pract.* 1997;47(417):205-10.
30. Olivar AC, Forouhar FA, Gillies CG, Servanski DR. Transmission electron microscopy: evaluation of damage in human oviducts caused by different surgical instruments. *Ann Clin Lab Sci.* 1999;29(4):281-5.
31. Pollack SV. Electrosurgery of the skin. New-York: Churchill Livingstone. 1991, 320 p.
32. Труфанов ВД, Иванов СЮ, Коган ЕА, Файзуллина НМ. Радиочастотные скальпели в челюстно-лицевой и пластической хирургии: экспериментальное, иммуногистохимическое исследование. СПб: ООО «Меди издательство». 2015. С. 90-3. [Trufanov VD, Ivanov SY, Kogan EA, Fajzullina NM. Radiofrequency scalpels in maxillofacial and plastic surgery: experimental, immunohistochemical study. Saint Petersburg. 2015. P. 90-3. (In Russ.)].
33. Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther.* 2016;33(6):894-909. DOI: 10.1007/s12325-016-0338-1.
34. Lu Gan, Song Zhang, Devesh Poorun, Dawei Liu, Xinpei Lu, Mengwen He, et al. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.* 2017;16(1):7-13. DOI: 10.1111/ddg.13373.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 02.11.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 02.11.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Lipova E.V. <https://orcid.org/0000-0001-6490-9529>.

Rakhmatulina M.R. <https://orcid.org/0000-0003-3039-7769>.

Glazko I.I. <https://orcid.org/0000-0001-8512-3736>.

Chekmarev A.S. <https://orcid.org/0000-0002-8831-4842>.

A.A. Ivanov^{1,2,3}, A.R. Krylov¹, A.G. Molokanov¹, A.Yu. Bushmanov², A.S. Samoylov²,
E.E. Pavlik¹, G.V. Mytsin¹, S.V. Shvidky¹, G.N. Timoshenko^{1,4}

MODELING OF LABORATORY ANIMALS EXPOSURE CONDITIONS BEHIND LOCAL CONCRETE SHIELDING BOMBARDED BY 650-MEV PROTONS

¹ Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia;

² A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia;

³ Institute of Biomedical Problems of RAS, Moscow, Russia;

⁴ Dubna State University, Dubna, Russia

Контактное лицо: G.N. Timoshenko, tim@jinr.ru

ABSTRACT

Purpose: To estimate the radiation fields formed after the passage of high-energy protons through the concrete protection for subsequent radiobiological experiments on animals on this model.

Material and methods: The results of the calculation of the secondary characteristics of a field of mixed radiation behind the local concrete with thickness 20, 40, and 80 cm, bombarded by a proton beam of 650 MeV at the JINR Phasotron and experimental estimation of the values of the absorbed dose phantoms of mice irradiated for protection during radiobiological experiments.

The calculation was performed by the Monte Carlo method according to the MCNPX program for secondary protons, neutrons, π -mesons, and gamma rays. To verify the adequacy of calculations was performed the comparison of calculated and measured in the experiment spatial distribution of activation threshold detectors for aluminum protection, as well as a comparison of the calculated values of absorbed dose for radiation protection with the results of absorbed dose measurements with a diamond detector.

Results: The calculations made it possible to obtain the characteristics of the fields of mixed secondary radiation behind local concrete shields of different thickness irradiated with protons with an energy of 650 MeV and to estimate the values of absorbed doses in the irradiation sites of mice in the radiobiological experiment. The reliability of the calculations was confirmed by experimental verification of the activation of aluminum threshold detectors behind a 20 cm thick protection, as well as direct measurements using a diamond detector.

Conclusion: The calculated assessment of radiation fields formed after protons pass through the concrete protection and its comparison with the results of radiation dose measurements for the subsequent radiobiological experiment on animals on this model in the interests of designing protective structures on the Moon and other space bodies, as well as biological defenses on charged-particles accelerators.

Key words: *proton beam, secondary radiation field, absorbed dose, radiation transport in a matter, concrete shielding, radiobiological experiment, regolith*

For citation: Ivanov AA, Krylov AR, Molokanov AG, Bushmanov AY, Samoylov AS, Pavlik EE, Mytsin GV, Shvidky SV, Timoshenko GN. Modeling of Laboratory Animals Exposure Conditions behind Local Concrete Shielding Bombarded by 650-MeV Protons. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):77-86.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-77-86

Introduction

During the operation of research and medical accelerators of high-energy charged particles, as well as during space flights, a person may be exposed to radiation fields of different nature. There are particles from cosmic radiation, which astronauts can be irradiated when they go into outer space or stay on the surface of the Moon or Mars, or, in cases of medical exposure of patients, accelerated charged particles. The secondary radiation fields behind the accelerator shielding are similar to the radiation fields arising from the interaction of space radiation with the shell and elements of the spacecraft. In addition to the above, there is irradiation from induced radioactivity. All these sources of radiation hazard must be taken into account, in particular, when designing shelters on the Moon and Mars. Most likely, for the construction of a protective building on the Moon or Mars, the lunar and Martian regolith will be used, which, in many respects, coincides in chemical composition with concrete which uses for radiation protection of nuclear physics facilities [1, 2]. In principle, the energy of galactic space particles can spread to huge value, but the maximum in the proton spectrum is near the energy of

the accelerated protons of the JINR Laboratory of Nuclear Problem phasotron.

The adequate calculation of radiation fields behind radiation shields can be carried out using a universal code for the transport of radiation in the matter by the Monte Carlo method [3]. These calculations should be supported by experimental testing, and also, in our opinion [4], by a radiobiological experiment on animals, since in this case, we obtain a direct integral assessment of the hazard of radiation exposure. All of the above made it possible to formulate the goal of this work as a calculated phantom estimate of the radiation fields formed after the passage of protons through a concrete shield and its comparison with the results of experimental testing for subsequent radiobiological experiments on animals on this model.

Material and methods

Before a radiobiological experiment on irradiation of mice with secondary radiation emitted from a local concrete shield of various thickness, irradiated by a proton beam with an energy of 650 MeV at the phasotron of the Laboratory of Nuclear Problems of the Joint Institute for Nuclear Research, mathematical modeling

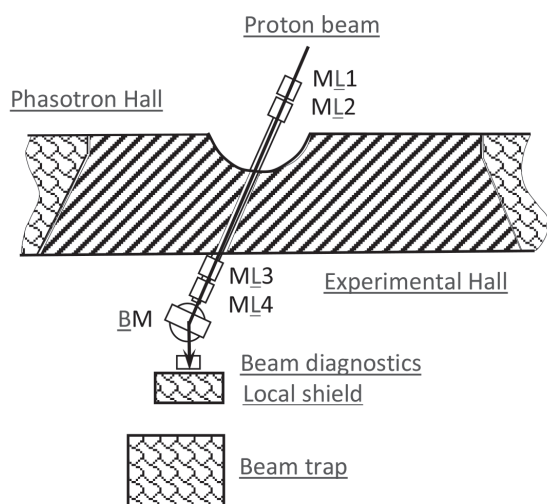


Fig. 1. Geometry of the experimental stand at the phasotron
ML — magnetic lenses, BM — bending magnet

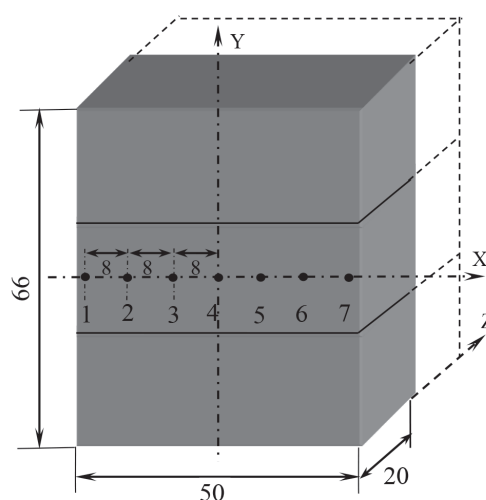


Fig. 2. Frontal projection of local shield

of the experiment was carried out using a universal code for the transport of radiation in the matter by the Monte Carlo method MCNPX ver. 6.2 [3] and experimental verification of the calculation results were carried out as well.

A stand for irradiation of animals was located in the experimental hall of the phasotron, separated from the accelerator by a massive shield. A beam of 650 MeV protons extracted from the phasotron, was transported with a magneto-optical channel consisting of two doublets of quadrupole lenses through a collimator in a shield to the experimental hall. In the hall, the proton beam was focused using a quadrupole lens doublet and a bending magnet and directed to an experimental stand consisting of a local shield and a beam diagnostics system (Fig. 1). Irradiation of animals is planned directly behind the local shields, in horizontally located cages — cells made of radiation-permeable material.

The local shield was mounted from ordinary concrete blocks 50 cm long, 20 cm wide, and 22 cm high with a density of 2.15 g/cm³. The total thickness of the shield along the beam was varied in the experiment from 20 to 80 cm. Behind the stand, at a distance of 1.5 m from it, there was a massive concrete beam trap, in which secondary radiation from the stand was absorbed. The horizontal and vertical profiles of the primary proton beam at the entrance to the local shield were measured using a multiwire ionization chamber. The intensity of the beam incident on the shield was measured with a plane-parallel wide-aperture air ionization chamber. The energy of the protons of the beam in the place of their entrance to the shield was estimated at 650 MeV.

Calculation of secondary radiation fields behind local shields

In the cascade of internuclear interactions when calculating the radiation fields behind the local shields and in the calculated doses received by laboratory animals were included protons, neutrons, π^+ and π^- mesons,

deuterons, ^3He and ^4He nuclei. The development of an electron-photon shower and the production of photoneutrons was also taken into account.

The beam of protons incident under the normal to the center of the local shield was accepted to be monoenergetic in the calculations. The spatial distribution of the beam was specified by a two-dimensional normal distribution with a width at half maximum in X and Y = 2 cm ($\sigma = 0.847$ cm). The results of all calculations were normalized to 1 beam proton. The weight composition of concrete in the calculations was taken from [2]: H — 0.006276; C — 0.058996; O — 0.5159; Mg — 0.0041841; Al — 0.0075313; Si — 0.14728; S — 0.0037656; Ca — 0.251046; Fe — 0.0050209.

The geometry of the experiment simulated in the calculations is shown in Fig. 2. The spatial distribution (along the X-axis) of the yields of protons, neutrons, charged π -mesons, and gamma quanta from the shield, as well as the values of the absorbed dose (for all field components) at the site of animal irradiation (points 1–7), were calculated. The lower energy threshold for neutrons was taken equal to 10^{-9} MeV, for protons and π -mesons — 1 MeV, for gamma quanta — 0.1 MeV. The calculations were carried out with three shielding thicknesses of 20, 40, and 80 cm. The statistical accuracy of the calculations was better than 2 % in the whole energy range.

Experimental verification of the secondary radiation fields validity

To check the validity of the calculations of the secondary radiation field behind the shields, carried out using the MCNPX program, the spatial distribution of the activation of aluminum detectors behind the shield 20 cm thick was measured. For the experiment, 7 detectors were prepared from chemically pure aluminum with dimensions of 2×1.5 cm, weighing about 13.4 g. To measure gamma spectra from activated detectors, a scintillation gamma spectrometer based on NaI(Tl)

crystal with a diameter and height of 40 mm was assembled, connected to a PMT-93 photomultiplier.

A large radiochromic film was used to study the spatial distribution of ionizing radiation from a concrete wall at a point lying on the continuation of the trajectory of the primary proton beam.

At the central points of the assumed placement of the mice behind the concrete shields, the absorbed doses of radiation were measured with a diamond detector.

Results and discussions

Shield 20 cm

In Fig. 3–6 the calculated spectral distributions of the fluences of secondary particles and gammas averaged over volumes of 39.3 cm^3 ($\varnothing = 5 \text{ cm}$, $h = 2 \text{ cm}$) at points 1–7 behind the 20 cm shield are demonstrated. The ordinate shows the values of fluences in the energy bins (energy discretization interval). Neutron spectra are presented on a logarithmic scale from 10^{-8} to 10^3 MeV .

The ionization range of protons with an energy of 650 MeV in concrete is more than 20 cm. The spectra of secondary protons are formed mainly due to elastic and quasi-elastic scattering of primary protons on the shielding nuclei, but at point 4 in the center of the shield, the initial protons of the beam make an overwhelming contribution to the proton spectrum, partially lost their

energy in the thickness of the shield. The neutron spectra clearly show characteristic features associated with the accumulation of thermal neutrons (10^{-8} – 10^{-7} MeV), evaporative neutrons (1 – 10 MeV), and cascade neutrons (around 100 MeV). Behind thin shielding, the fraction of thermal neutrons is insignificant, because, firstly, there is very little chemically bound water in concrete, and secondly, neutrons in such a small layer of matter cannot thermalize. The threshold for π -meson production in nuclear reactions is about 300 MeV , so their energy also does not exceed 200 – 300 MeV . The maximums appear in the gamma-ray spectra correspond to the energies of annihilation gamma rays, and, probably, to the ~ 1.8 and $\sim 6 \text{ MeV}$ lines from silicon and oxygen. In the energy range $\sim 100 \text{ MeV}$, the accumulation of gamma rays is associated with the decay of π^0 -mesons, which are produced mainly in the direction of the primary proton beam.

The spatial distributions of the fluences of all components of the secondary radiation field behind the shield — neutrons, protons, π -mesons, and gamma rays, along the X-axis of a concrete shield 20 cm thick are shown in Fig. 7. The range of 650 MeV protons in concrete with a density of 2.15 g/cm^3 is 95.2 cm [5], i.e. formally exceeds the thickness of even the thickest shield 80 cm. Therefore, some of the primary beam protons that have not interactions in concrete escape from the shield at point 4, forming a sharp maximum in the spatial

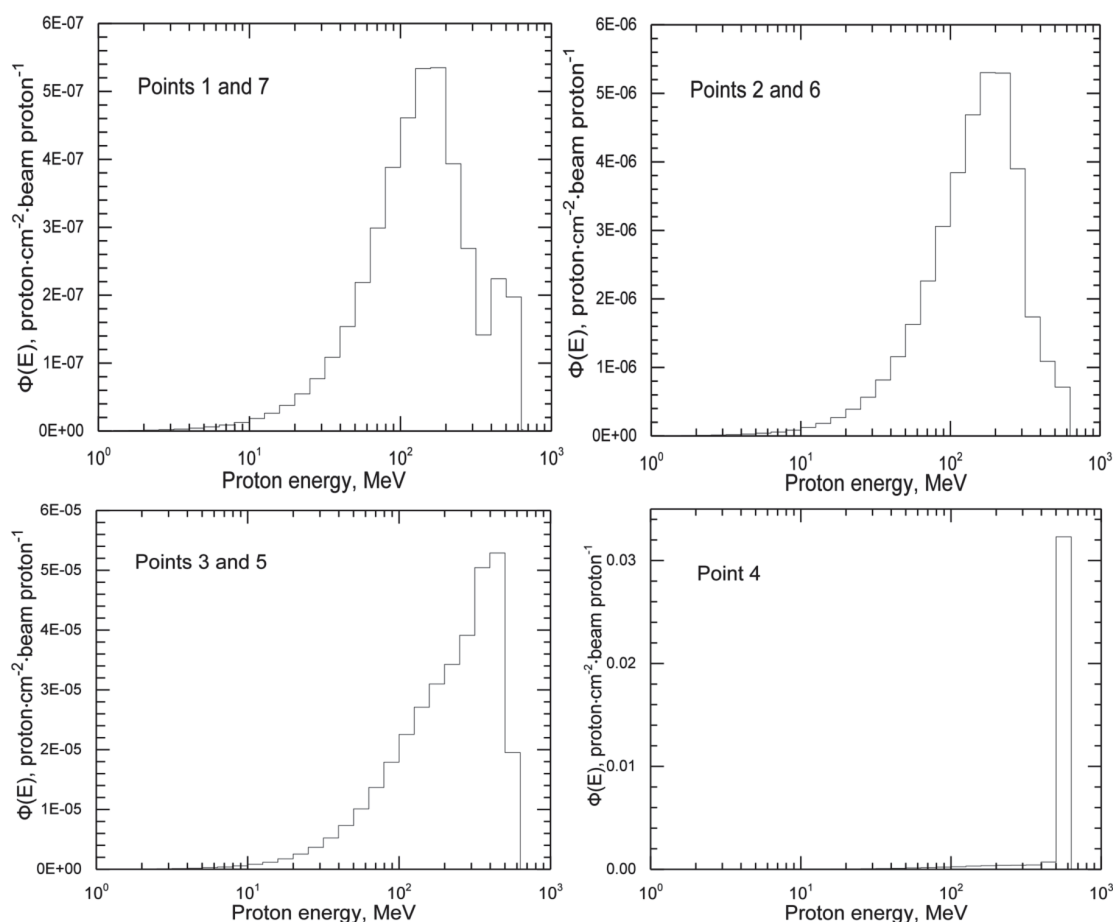


Fig. 3. Spectra of protons behind the 20 cm concrete shield

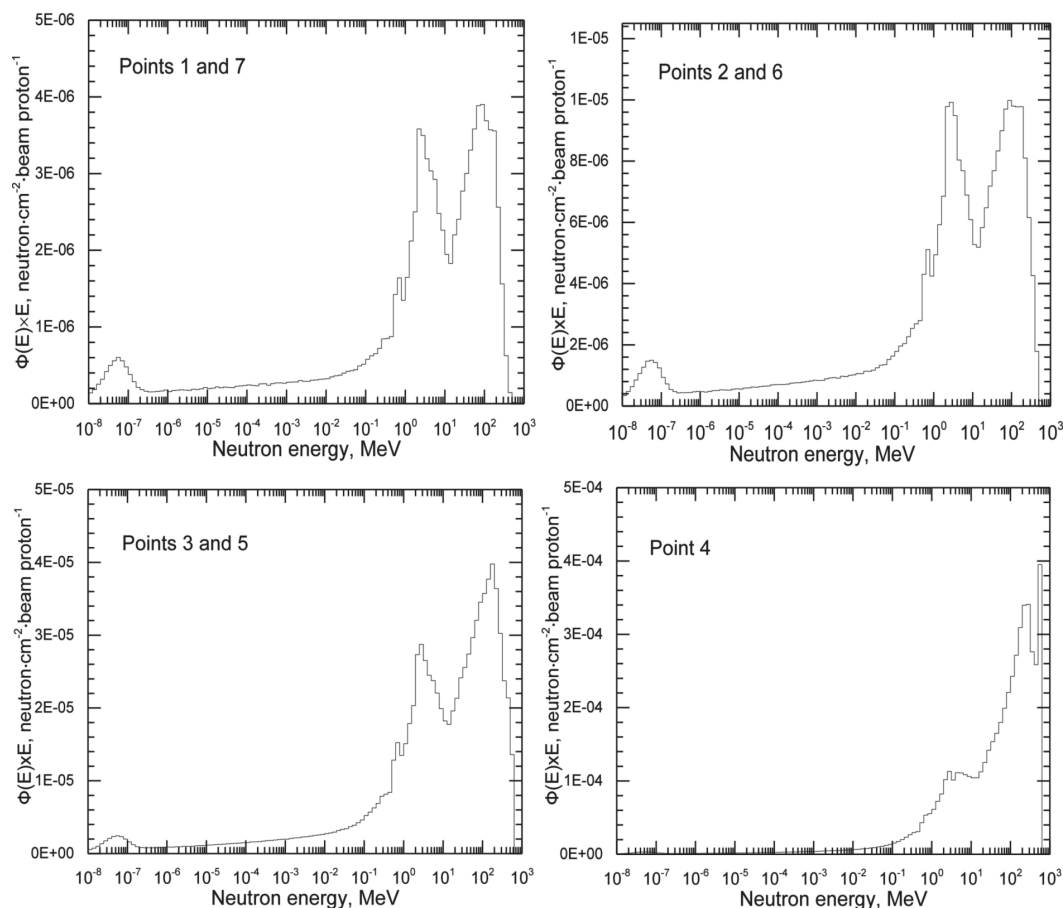


Fig. 4. Spectra of neutrons behind the 20 cm concrete shield

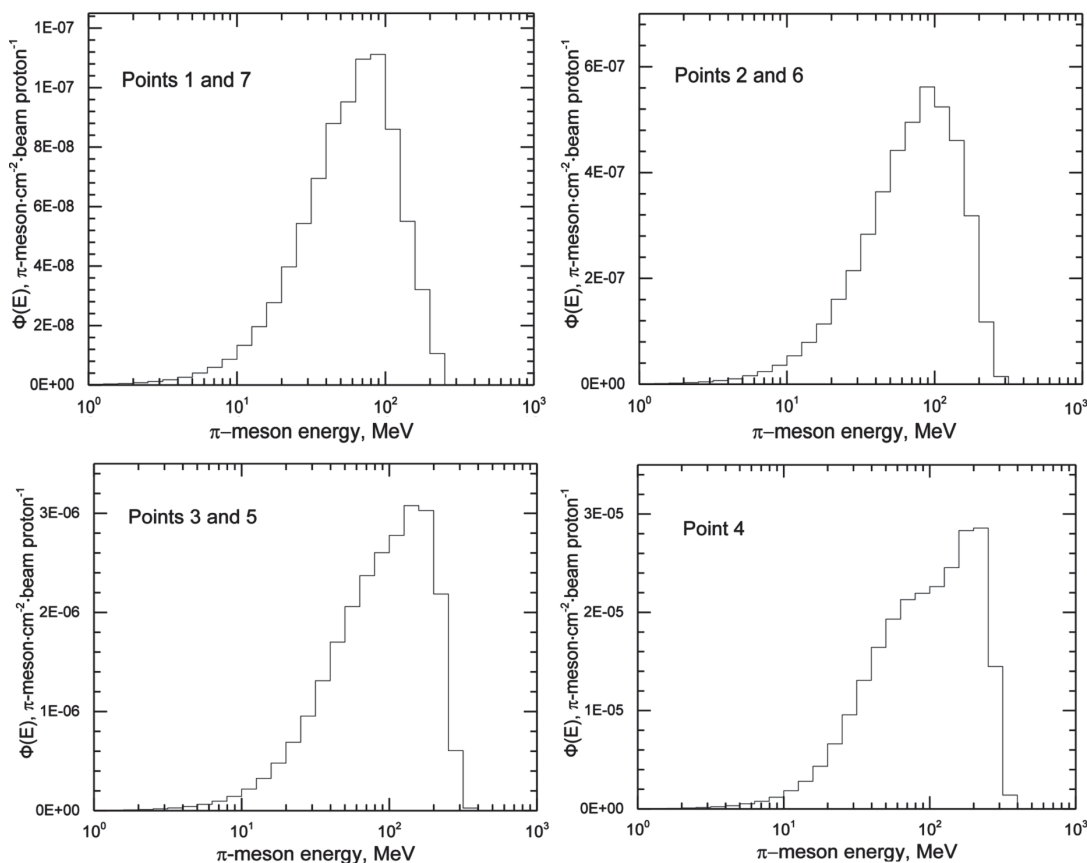


Fig. 5. Spectra of π -mesons behind the 20 cm concrete shield

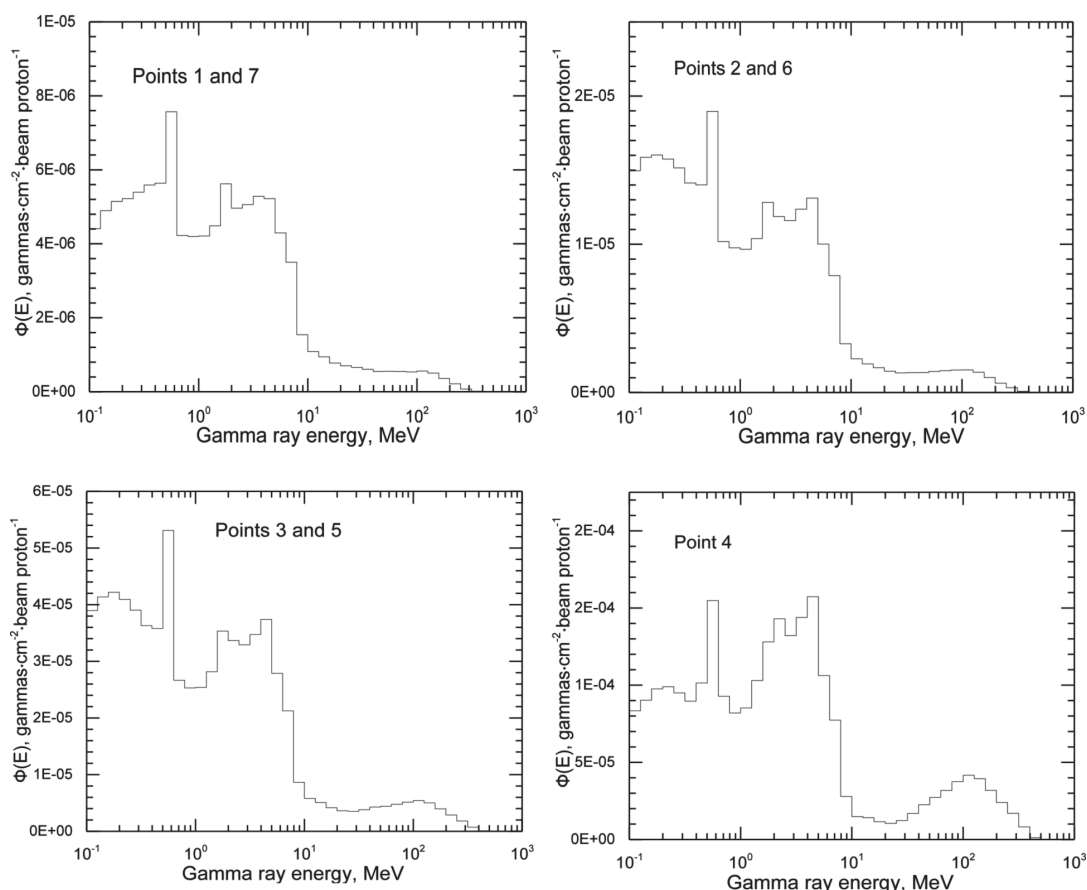
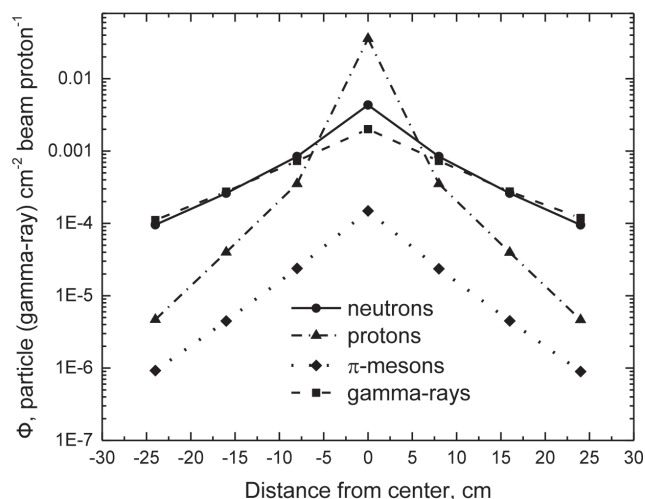


Fig. 6. Spectra of gamma rays behind the 20 cm concrete shield

Fig. 7. Spatial distributions of neutrons, protons, π -mesons and gamma-rays behind the 20 cm concrete shield

distribution of the proton fluence. The spatial distribution of neutrons does not have a sharp maximum in the shield center, but on the edges of the shield, neutrons make an overwhelming contribution to the total hadron fluence. The production of gamma rays is mainly determined by the reactions of inelastic scattering or capture of neutrons, and the spatial distribution of gamma-ray

fluences practically coincides with the distribution of neutron fluences. Thus, the component composition of the radiation field behind the shield varies over a very wide range depending on the position of the point under consideration, since with such a thickness, concrete is more a multiplying target than a shielding. As a result, in the center of the shield, the main contribution to the dose will be created by high-energy protons, and at the edges of the shield, the dose will be created mainly by neutrons.

Shield 40 cm

In Fig. 8 the spatial distributions of the fluences of all components of the secondary radiation field along the X-axis of a 40 cm thick concrete shield are presented. The spatial distribution of hadron fluences behind the 40-cm shield is flatter than behind the 20-cm shield since, with an increase in the thickness of the shield, the internuclear cascade begins to play an increasing role, and protons at the edges of the shield are formed in the interactions of neutrons with nuclei in the last layer of the shield. The proton fluences in the central part of the shield are relatively reduced compared to the 20-cm shield, but the small-angle scattering of the primary beam protons, as well as some of the beam protons that have not any interactions with concrete, still create a sharp maximum of the field behind the shield along the beam axis. The number of π -mesons behind the shield also decreases due

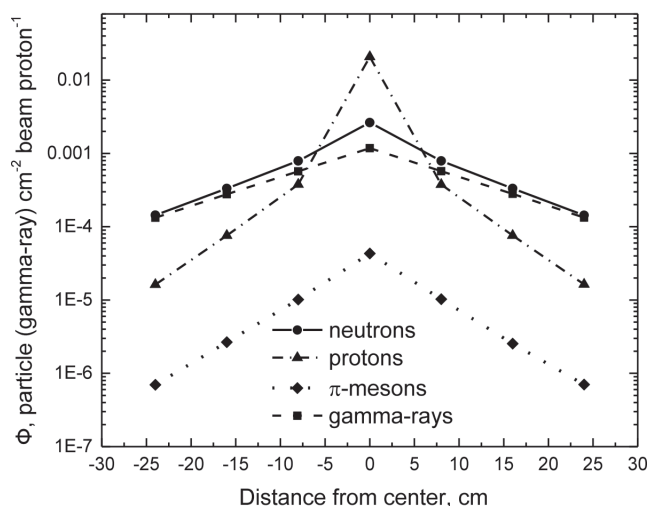


Fig. 8. Spatial distributions of neutrons, protons, π -mesons and gamma-rays behind the 40 cm concrete shield

to the lowering of the average energy of nucleons in the shield.

Shield 80 cm

The spatial distributions of the fluences of all components of the secondary radiation field along the X-axis behind the concrete shield 80 cm thickness are shown (Fig. 9). It's clear that behind the thick 80 cm shield, the spatial distributions of secondary hadrons are practically completely formed as a result of the internuclear cascade since the free path to inelastic interaction in the concrete of even high-energy neutrons (close to the energy of the primary protons of the beam) is about 40 cm. The yield of hadrons from the shield decreases because, with such shield thickness, radiation attenuation in concrete begins to prevail. Due to the dissipation of the nucleon's energy in the shield, the yield of π -mesons from it becomes negligible.

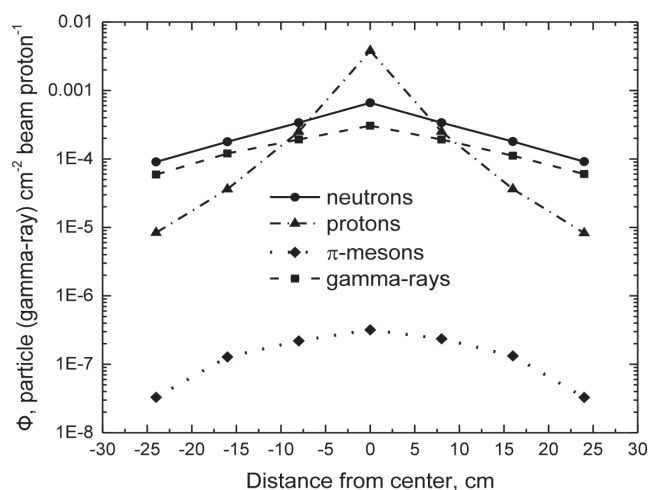


Fig. 9. Spatial distributions of neutrons, protons, π -mesons and gamma-rays behind the 80 cm concrete shield

In Fig. 10-11 the spectral distributions of the fluences of secondary nucleons at points 1, 7, and 4 behind the concrete shield 80 cm for comparison with the distributions behind the shield 20 cm thick are presented. In Fig. 10 it can be seen that at the central point behind the shield there is still a small fraction of the primary beam protons and protons generated in acts of small-angle elastic and quasi-elastic scattering. In general, the main part of protons is produced in neutron reactions in the last layer of the shield as a result of the internuclear cascade. Therefore, a large number of low-energy protons appear in the proton spectrum, in contrast to the proton spectra behind a 20 cm thick shield.

The neutron spectra in Fig. 11 are typical for neutron spectra behind thick shields. In the low-energy region, there is an accumulation of thermal neutrons, in the energy region of about 1 MeV there is an accumulation of evaporative neutrons, and in the region of ~ 200 MeV, there is a peak due to cascade neutrons. Comparison of the spectra of protons and neutrons behind shields 20 and 80 cm thick shows that the shielding thickness strongly affects the component and spectral composition of the secondary radiation field.

Experimental verification of the calculation of the secondary radiation field behind the concrete 20 cm shield

The verification of the calculations was carried out based on the threshold activation detectors at points 1-7 behind the shield 20 cm thick. In the experiment, the spatial distribution of the activation of aluminum detectors with the formation of ^{24}Na radionuclide was measured. A similar distribution of detector activity in saturation was calculated using the MCNPX code.

As a result of ^{27}Al activation (100 % abundance) by secondary protons, neutrons, and π -mesons, several radionuclides are formed (see Table 1), including the ^{24}Na radionuclide with a half-life of 14.96 hours, which emits two gamma lines with energies of 1.369 and 2.754 MeV (100 % yield per decay) [6].

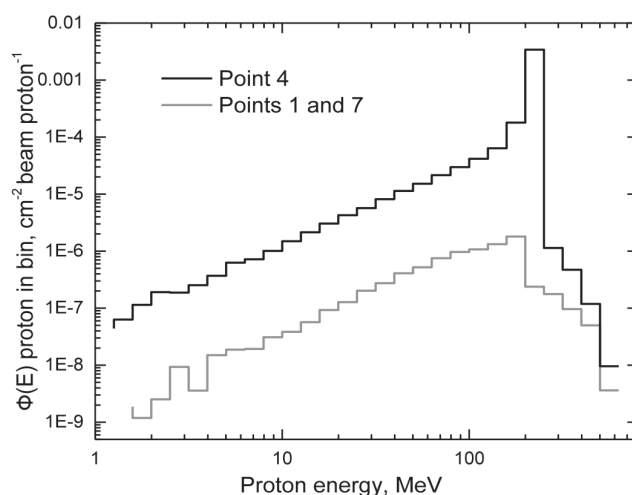


Fig. 10. Spectra of protons at points 1, 7 and 4 behind the shield 80 cm thick

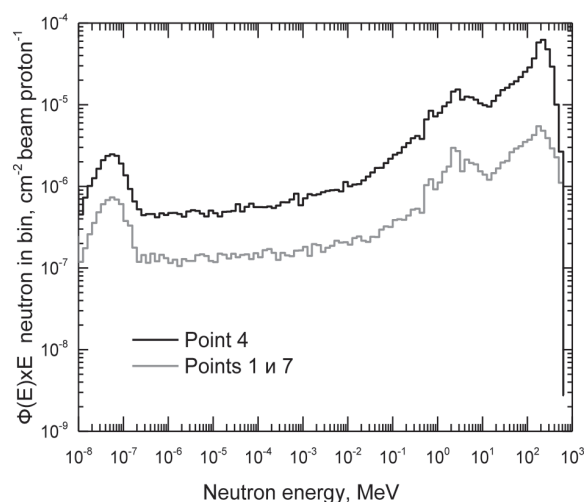


Fig. 11. Spectra of neutrons at points 1, 7 and 4 behind the shield 80 cm thick

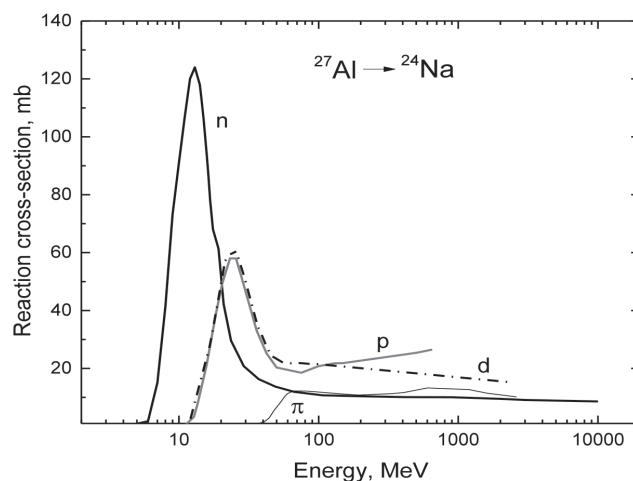


Fig. 12. Cross sections for the activation reactions of ^{27}Al by hadrons to form ^{24}Na

Table 1

Characteristics of radionuclides formed at the activation of ^{27}Al by high-energy hadrons

Radionuclides*	Reaction	Gamma line energy, MeV	Yield per decay, %	Half-life
^{24}Na , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^{24}\text{Na}$	3.8236 2.7541 1.3685	0.064 100 100	14.96 h
^{22}Na , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^{22}\text{Na}$	1.2745 0.511	100 180	2,602 y
^{28}Al , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{n}, \text{g})^{28}\text{Al}$	1.779 0.511	100	2.24 min
^{26}Al , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{n}, 2\text{n})^{26}\text{Al}$	1.809 0.55	100 164	720000 y
^{27}Mg , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{n}, \text{p})^{27}\text{Mg}$	0.844 1.014	72 28	9.46 min
^{18}F , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^{18}\text{F}$	0.511	190	109.74 min
^{13}N , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^{13}\text{N}$	0.511	200	10 min
^{11}C , β -decay	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^{11}\text{C}$	0.511	200	20.5 min
^7Be , e-capture	$^{27}\text{Al}(\text{A}, \text{X})^7\text{Be}$	0.4776	10	53.44 d

Note: *The remaining possible radionuclides are either pure β -decayers or have very short half-lives (milliseconds and microseconds)

The half-lives of radionuclides ^{22}Na and ^{26}Al with energetic gamma lines and ^7Be are much longer than the half-life of ^{24}Na , i.e. their activity is significantly lower than that of ^{24}Na . Radionuclides ^{28}Al , ^{27}Mg , ^{18}F , ^{13}N , and ^{11}C have half-lives much shorter than those of ^{24}Na , therefore, with appropriate delay after irradiation, their contribution to the total activity can also be made negligible. In fact, in the period from several hours to several tens of hours after the irradiation of a ^{27}Al detector, its induced activity is determined only by the ^{24}Na radionuclide. Another important practical advantage of ^{24}Na is the high energy of one of its lines — 2.754 MeV since there are practically no background events in this energy range when measuring the gamma spectrum from activated aluminum.

The cross-sections for the ^{27}Al activation reactions by neutrons, protons, and deuterons with the formation of ^{24}Na are shown in Fig. 12 [7]. There are no data on the similar activation of ^{27}Al by π -mesons.

For the experiment, we used activation detectors made of chemically pure aluminum. The measurement of gamma-ray spectra from activated detectors was carried out by a scintillation gamma-spectrometer based on a NaI(Tl) crystal with a diameter and height of 40 mm, placed inside a lead shield.

The activity of the detectors was measured 1 hour after irradiation, so that the short-lived nuclides ^{28}Al , ^{27}Mg , ^{13}N , ^{11}C had time to decay. Corrections were made to the detector activity during the decay time between the end of irradiation and the beginning of spectra measurement on the spectrometer, as well as corrections for the detector irradiation time and measurement time. The measurement results were the saturation activities of the detectors due to the activation of ^{27}Al by the secondary radiation from the shield.

The comparison of the spatial distributions of activities in the saturation of aluminum detectors behind the 20 cm shield calculated using the MCNPX code and measured in the experiment is shown in Fig. 13. The calculation and experimental results are normalized to the readings of the central (4th) detector.

In general, the agreement between the calculation and experiment is quite satisfactory, taking into account the fact that the cross-section of the proton beam at the point of their entrance to the shield in the experiment (width at half maximum: in X — 5.3 cm, in Y — 4 cm) was noticeably wider than it was accepted in the calculation. This caused some expansion of the spatial distribution of hadron yields from the shield and, accordingly, the experimental spatial distribution of the detector activity in comparison with the calculation. The calculations also did not take into account the activation of detectors by p-mesons and background scattered radiation. The performed experimental verification gives reason to believe that the radiation fields behind the shields were

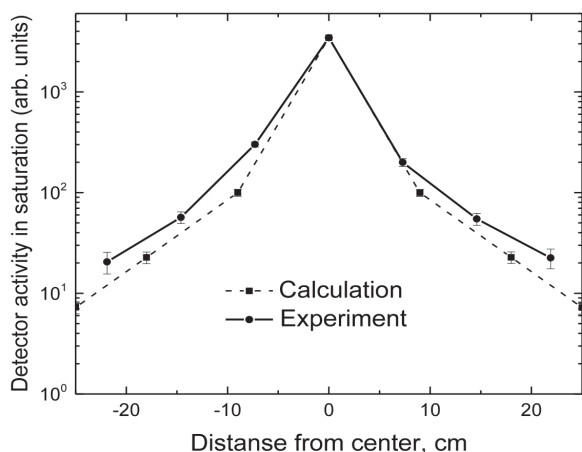


Fig. 13. Comparison of the calculated and measured spatial distributions of the activities of aluminum detectors behind the 20 cm thick shield

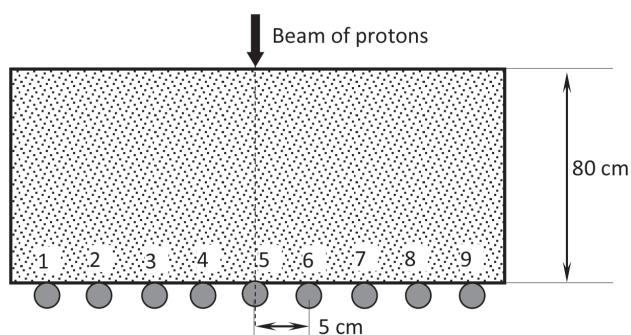


Fig. 14. Location of mouse phantoms behind the 80 cm thick shield

calculated using the MCNPX code with a high degree of reliability.

Calculation of absorbed doses in phantoms of mice behind concrete shields

The location of 9 phantoms of mice behind a concrete shield 80 cm thick is shown in Fig. 14. Mice were modeled with $\varnothing$ 3.66 cm phantoms filled with water as an analog of biological tissue. The volume of the phantom corresponds to the weight of water 25 g — the average weight of an adult mouse.

For each phantom, the energy distributions of particles (protons, neutrons, charged π -mesons) and gamma rays averaged over the phantom volume were calculated, as well as the energy losses of radiation in its volume. Partial absorbed dose in the phantom volume for each radiation component was determined as a result of dividing the corresponding energy loss by the phantom mass. The calculated values of the absorbed doses in units of Gy/beam proton in mice phantoms from protons, neutrons, charged π -mesons, and gamma rays are given in Table 2.

Protons make an overwhelming contribution to the total absorbed dose of mice phantoms. The second most important component is neutrons, next is gamma rays and the least component is mesons.

Behind shields 40 and 20 cm thick, the values of the absorbed doses in the phantoms of mice were calculated in the extreme 1, 9, and the central phantom 5. The values of the absorbed doses, normalized to 1 beam proton, are given in Table 3.

Noteworthy is the fact that if for phantom 5 the dose decreases monotonically as the thickness of the shield increases, then for phantoms 1 and 9 (at the edges of the shield) the dose first increases at a thickness of 40 cm, and then begins to decrease (thickness of 80 cm). This is due to the mechanism of the secondary radiation field formation in the shielding. In extreme phantoms, the absorbed dose is mainly due to secondary neutrons. With an increase in

Table 2

Absorbed doses D per 1 beam proton in mice phantoms behind 80 cm shield

N° phantom	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D neutrons, Gy	1.12E-14	1.65E-14	2.62E-14	4.11E-14	7.28E-14	4.61E-14	2.74E-14	1.70E-14	1.13E-14
D protons, Gy	2.04E-14	4.99E-14	1.33E-13	8.11E-13	3.29E-12	8.09E-13	1.38E-13	5.02E-14	1.94E-14
D gammas, Gy	6.52E-16	8.47E-16	1.19E-15	1.59E-15	1.97E-15	1.62E-15	1.17E-15	8.23E-16	5.71E-16
D π -mesons, Gy	3.46E-17	1.04E-16	1.13E-16	1.91E-16	2.08E-16	1.64E-16	1.19E-16	9.01E-17	5.05E-17
ΣD , Gy/beam proton	3.23E-14	6.73E-14	1.61E-13	8.60E-13	3.36E-12	8.57E-13	1.64E-13	6.81E-14	3.13E-14

Table 3

Absorbed doses D per 1 beam proton in mice phantoms behind 40 and 20 cm shields

Shield thickness	Shield 40 cm			Shield 20 cm		
N° phantom	1	5	9	1	5	9
D neutrons, Gy	1.36E-14	3.29E-13	1.36E-14	9.44E-15	5.99E-13	9.44E-15
D protons, Gy	2.90E-14	1.94E-11	2.90E-14	1.50E-14	3.96E-11	1.50E-14
D π -mesons, Gy	8.26E-16	2.10E-14	8.26E-16	1.88E-15	7.46E-14	1.88E-15
D gamma rays, Gy	1.87E-15	1.40E-14	1.87E-15	2.14E-15	4.10E-14	2.14E-15
ΣD , Gy/beam proton	4.53E-14	1.97E-11	4.53E-14	2.97E-14	4.04E-11	2.97E-14

Table 4

Estimations of absorbed doses of mice in cells, Gy

N° cell	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Shield 20 cm	0,11	0,27	0,73	4,52	13,9	6,8	0,55	0,33	0,23
Shield 40 cm	0,14	0,23	0,45	3,5	8,45	4,12	0,72	0,25	0,12
Shield 80 cm	0,11	0,21	0,5	1,6	2,65	1,1	0,21	0,17	0,1

the shield thickness, secondary neutrons first accumulate in it, and then the attenuation of their fluence according to the exponential law prevails. In phantom 5, in the center of the shield, the absorbed dose is determined by protons (including beam protons), the fluence of which behind the shield decreases with increasing shield thickness.

Comparison of the calculated absorbed doses behind shields with the results of dose measurements by diamond detectors

At the central points of the planned placement of the mice behind the concrete shields, the absorbed dose was measured with a diamond detector. This made it possible to compare, in the first approximation, the calculated and experimental values of the absorbed doses in the secondary field of mixed gamma-hadron radiation. Since the calculations were performed for one primary proton of the beam, the calculation data were normalized to the number of beam protons that bombarded the shield during the measurement with a diamond dosimeter for comparison with the experiment. Estimates showed that 3.73×10^{11} protons came to the shield during the measurements. The calculated values of absorbed doses in the central (5th) cell behind the shields were multiplied by this value with the experimental values of doses measured by a diamond detector. In all experiments, the proton dose at the entrance to the concrete shield was 25 Gy, with an average dose rate of 0.6 Gy/s.

Fig. 15 shows the results of comparing the calculations of absorbed doses in cells No. 5 behind the shields with the experimental values of doses measured by a diamond detector.

In whole, the agreement between the calculations and experiment is quite satisfactory, if we take into account the asymmetry of the proton beam profile that took place in some runs, caused by objective reasons (distortion of the left parts of the distribution behind the shields due to the conditions of formation of the primary proton beam, the presence of background gamma-rays and neutrons and differences in the absorbing medium in calculations and experiment (water phantom with a diameter of 3.66 cm and a diamond crystal with a volume of 5 mm³).

Then, the radiation doses were estimated at nine points of the proposed location of the mice (Fig. 14). The results are shown in Table 4. These estimations were

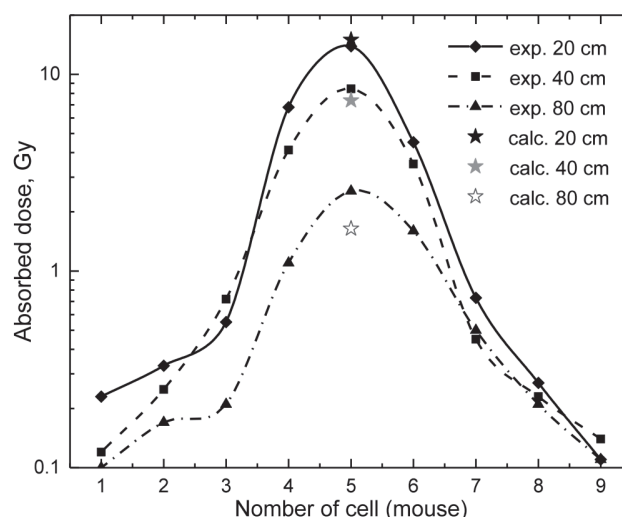


Fig. 15. Comparison of the calculated and experimental values of the absorbed dose behind shields with different thickness

carried out for carrying out a radiobiological experiment at this stand.

Conclusion

With a proton beam of the JINR phasotron the stand for radiobiological experiment behind concrete shields of various thicknesses was created. Calculations of the radiation fields generated in the shields have been carried out and, on their basis, the values of absorbed doses in the mice phantoms at several points behind the shields have been evaluated. Experimental checks of the calculations in the points of the mice placement were carried out using activation detectors and a diamond detector. Radiobiological experiments on animals at this stand are planned in the interests of designing a protective building on the Moon and other space bodies, as well as at charged particle accelerators.

Acknowledgment

The authors thank the head of the laboratory of the State Research Center – A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency Igor Nikolaevich Sheino for valuable recommendations on the presentation of these experiments in the article.

Моделирование условий облучения лабораторных животных за локальной бетонной защитой, облучаемой протонами с энергией 650 МэВ

А.А. Иванов^{1,2,3}, А.Р. Крылов¹, А.Г. Молоканов¹, А.Ю. Бушманов², А.С. Самойлов²,
Е.Е. Павлик¹, Г.В. Мицин¹, С.В. Швидкий¹, Г.Н. Тимошенко^{1,4}

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

³ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва,

⁴ Государственный университет “Дубна”, Дубна

E-mail: tim@jinr.ru

РЕФЕРАТ

Приведены результаты расчета характеристик поля смешанного вторичного излучения за локальными бетонными защитами толщиной 20, 40 и 80 см, облучаемых пучком протонов с энергией 650 МэВ на фазотроне ОИЯИ, а также оценки значений поглощенной дозы облучения лабораторных животных за защитами в ходе радиобиологического эксперимента. Расчет выполнен методом Монте-Карло по программе MCNPX для вторичных протонов, нейтронов, пи-мезонов и гамма-квантов. С целью проверки достоверности расчетов было выполнено сравнение расчетных и измеренных в эксперименте пространственных распределений активации пороговых алюминиевых детекторов за защитами. Сравнение показало хорошее согласие между экспериментальными и расчетными величинами.

Ключевые слова: пучок протонов, поле вторичного излучения, поглощенная доза, транспорт излучений в веществе, бетонная защита, радиобиологический эксперимент

Для цитирования: Иванов А.А., Крылов А.Р., Молоканов А.Г., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С., Павлик Е.Е., Мицин Г.В., Швидкий С.В., Тимошенко Г.Н. Моделирование условий облучения лабораторных животных за локальной бетонной защитой, облучаемой протонами с энергией 650 МэВ. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):77-86.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-77-86

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ignatova AM, Ignatov MN. Use of resources for regolith exploration of the lunar surface. Int J Exper Education. 2013;11:101-10. (In Russ.).
2. Broder DL, Zaitsev LN, Komochkov MM. Concrete in the protection of nuclear installations. Atomizdat, Moscow. 1966. (In Russ.).
3. MCNPX User's Manual Version 2.6.0, April 2008 LA-CP-07-1473

4. Ivanov AA, Molokanov AG, Shurshakov VA, et al. Modification of the proton beam physical parameters and radiobiological characteristics by elements of spacecraft radiation protection. Aerospace and Environmental Medicine. 2015;49(5):36-42. (In Russ.).
5. <http://www.nea.fr/abs/html/nea-0919.html>.
6. Reference Neutron Activation Library. IAEA-TECDOC-1285. Vienna. 2002.
7. <http://www-nds.iaea.org/exfor>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 19.10.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 19.10.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Ivanov A.A. <https://orcid.org/0000-0001-8403-8636>.

Timoshenko G.N. <https://orcid.org/0000-0001-8801-5319>.

А.С. Самойлов, Е.В. Голобородько, Т.А. Астрелина, Е.В. Дедова, И.В. Чуковская, Т.В. Губаева
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ ЯДЕРНОЙ
И ГЕНОМНОЙ МЕДИЦИНЫ

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

СОДЕРЖАНИЕ

1. Правовые основы инновационной медицинской деятельности на примерах ядерной и геномной медицины.
2. Актуальность данной тематики с учетом современного уровня развития науки и техники.
3. Понятия «радионуклидная терапия», «геномная терапия», способы их правового регулирования в российском законодательстве.
4. Обоснование необходимости разработки специальных стандартов и порядков оказания медицинской помощи по группам заболеваний, которые предусматривают использование радиофармацевтических препаратов и редактирование генома человека.
5. Перспективы изменения права в условиях развития генетических и ядерных технологий.

Ключевые слова: ядерная медицина, геномная медицина, правовое регулирование, генетическое редактирование, биомедицинские технологии, радиофармацевтические препараты, радионуклидная терапия

Для цитирования: Самойлов А.С., Голобородько Е.В., Астрелина Т.А., Дедова Е.В., Чуковская И.В., Губаева Т.В. Сравнительный анализ правового регулирования ядерной и геномной медицины. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):87-92.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-87-92

Введение

В настоящее время используется целый ряд инновационных техник лечения больных с различными заболеваниями. Среди них имеют наибольшую актуальность и вызывают интерес радионуклидная и геномная терапии. Сразу необходимо сказать, что развитие ядерной и геномной медицины требуют первичного серьезного вливания финансовых ресурсов для успешного развития данных отраслей лечения, поскольку суммарная стоимость препаратов для радионуклидной и генетической диагностики, а также радиофармацевтических препаратов и технологий редактирования генома оценивается в несколько миллиардов долларов. Также, помимо специфичной организационной составляющей данных видов лечения заболеваний и необходимости финансовых затрат, следует отметить отсутствие в законодательстве положений, напрямую относящихся к данным видам лечения и регулирующим его процесс.

Особенности правового регулирования ядерной медицины

Рассмотрим основные аспекты ядерной медицины, а именно: понятие, виды заболеваний, способы лечения и диагностики, особенности такого лечения и имеющиеся в государстве правовые механизмы регулирования данного вида лечения.

Под ядерной медициной традиционно понимается раздел медицины, в котором для диагностики и лечения в организм человека или в биологические среды вне организма вводятся небольшие количества радиофармацевтических препаратов, представляющих собой открытые источники ионизирующего излучения [1].

В направление данного лечения включают радионуклидную диагностику (РНД) — это лучевое исследование, основанное на использовании соединений,

меченных радионуклидами. В качестве таких соединений применяют разрешенные для введения человеку радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП) — химические соединения, в молекуле которых содержится определенный радионуклид [2]. Радионуклидная диагностика дает возможность путем измерения активности радионуклида во времени и пространстве получить информацию о метаболическом и функциональном состоянии тканей, органов и систем, представляемую в цифровом виде, в виде графика или картины пространственного распределения РФЛП в тканях различных органов и системах жизнедеятельности человека. Радионуклидная терапия (РНТ) заключается во введении в организм человека РФЛП, которые формируют в патологических очагах терапевтически значимые поглощенные дозы ионизирующего излучения, что позволяет добиться излечения отдельных метастазов и диссеминированных опухолей при незначительных побочных эффектах и минимальном повреждении здоровых тканей. В России нуждаемость в РНТ оценивается примерно в 350 тыс. пациентов, из них около 100 тыс. РНТ не проводится по причине отсутствия или недостаточного технического и радиофармацевтического обеспечения клиник. Общая характеристика представленных направлений ядерной медицины указывает на необходимость серьезных финансовых вложений для успешного развития.

Правовая база данной отрасли основывается в первую очередь на Федеральном законе от 21 ноября 2011 года № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Однако обращение к тексту нормативного акта показывает, что особенности ядерной медицины в нем не отражены. При дальнейшем анализе правовой базы, относящейся к такому виду лечения, нельзя не отметить Федеральный закон от 09.01.1996 № 3-ФЗ «О радиа-

ционной безопасности населения», который определяет правовые основы обеспечения радиационной безопасности населения в целях охраны его здоровья. Так, в соответствии со статьей 17 указанного Федерального закона при проведении медицинских рентгенорадиологических процедур следует использовать средства защиты граждан (пациентов). Дозы облучения пациентов при проведении таких медицинских процедур должны соответствовать нормам, правилам и нормативам в области радиационной безопасности.

При этом уже достаточно давно постановлением Главного государственного санитарного врача России от 26 апреля 2010 г. № 40 утверждены Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010), а 18 февраля 2003 г. — Гигиенические требования к устройству и эксплуатации рентгеновских кабинетов, аппаратов и проведению рентгенологических исследований (Постановление Главного государственного санитарного врача России от № 8 (СанПиН 2.6.1.1192-03).

Последний из этих двух нормативных документов условно можно отнести к ядерной медицине в связи со все расширяющимся применением в клинической практике установок для гибридной медицинской визуализации (ОФЭКТ/КТ и ПЭТ/КТ).

Так, при проведении диагностики и/или лечения по требованию гражданина (пациента) ему предоставляется полная информация об ожидаемой или о получаемой им дозе облучения и о возможных последствиях при проведении рентгенорадиологических процедур. При назначении рентгенорадиологического исследования врач должен:

- обосновать проведение исследования таким образом, чтобы необходимость конкретной визуализации стала очевидной для врача, который несет ответственность за целесообразность проведения исследования;

- указать предварительный диагноз, при котором возможна визуализация патологических изменений в организме;

- иметь представление о распространенности в данном месте того или иного заболевания и его визуализации с использованием рентгена и(или) радионуклидов;

- быть осведомленным о показаниях и противопоказаниях для проведения данного исследования;

- знать дозу облучения, которую получит пациент;

- представить информацию по требованию пациента о возможных последствиях облучения.

В частности, данные положения при назначении рентгенологических исследований закрепляются в Методических рекомендациях от 06 февраля 2004 г. № 11-2/4-09 «Защита населения при назначении и проведении рентгенологических исследований». Такие рекомендации предназначены для подготовки специалистов санитарно-эпидемиологической службы, осуществляющих надзор за медицинским облуче-

нием, врачей-рентгенологов и рентгенолаборантов в системе последиplomного образования по вопросам радиационной безопасности, а также врачей лечебного профиля, от которых зависит обоснованность назначения рентгенологических процедур.

В медицинской практике польза, получаемая пациентом от проведенного ему рентгенорадиологического исследования, выражающаяся в постановке правильного и своевременного диагноза, как правило, превосходит вред, причиненный здоровью, за счет применения сравнительно небольших доз облучения, применения защиты и т.д. [3]. Поэтому ни отечественные, ни международные нормативные акты в области радиационной безопасности не предусматривают индивидуальные дозовые пределы для диагностического облучения. Формальное установление подобных пределов могло бы воспрепятствовать проведению необходимых по клиническим показаниям рентгенорадиологических исследований и процедур и тем самым нанести гораздо больший ущерб здоровью пациента, чем гипотетические отсроченные вредные последствия медицинского облучения.

Помимо изложенного, на медицинское облучение полностью распространяется действие двух других главных принципов радиационной безопасности: исключение всякого необоснованного облучения и снижение дозы излучения до минимально достижимого уровня.

С целью предотвращения необоснованного облучения пациента на всех этапах обследования должны быть учтены результаты ранее проведенных исследований. Пациент имеет право отказаться от проведения исследований, за исключением рентгенорадиологических диагностических исследований, проводимых с целью выявления эпидемиологически опасных заболеваний (п. 3 ст. 17 Федерального закона «О радиационной безопасности населения»).

Также в целях безопасности проведения лечения, в методических указаниях МУ 2.6.1.1892-04 «Гигиенические требования по обеспечению радиационной безопасности при проведении радионуклидной диагностики с помощью радиофармпрепаратов» (утв. Главным государственным санитарным врачом России 04.03.2004) определены требования к санитарно-техническому оснащению помещений для таких исследований *in vivo*; требования к размещению, планировке и оснащению помещений ПЭТ-центров, требования к системе вентиляции, к организации и проведению работ с РФЛП. Документом устанавливается, что организация и проведение работ с РФЛП осуществляется при исключении избыточного облучения больных, а также защиту персонала от профессионального облучения.

К работе с РФЛП допускаются только лица, имеющие соответствующую квалификацию, дающую право на работу в подразделении. Работа с РФЛП разрешается только в тех помещениях, которые указаны в санитарно-эпидемиологическом заключении. Методические указания закрепляют также специ-

альные требования к получению, хранению, использованию и учету РФЛП, а также требования к сбору, хранению, удалению и учету радиоактивных отходов. Так, каждая процедура с использованием РФЛП подлежит учету в журнале введения РФЛП пациентам; предусматриваются меры обеспечения радиационной безопасности пациентов. Только лечащий врач может принять решение о необходимости проведения радиодиагностического исследования. Однако ответственность за проведение радиодиагностического лечения несет врач-радиолог, проводящий процедуру, так как именно он принимает окончательное решение о типе и методике процедуры. Врач-радиолог имеет право отказаться от проведения радиодиагностической процедуры при отсутствии клинических показаний и (или) при отсутствии обоснования в направлении на процедуру. О принятом решении он информирует лечащего врача и фиксирует свой мотивированный отказ в амбулаторной карте, истории болезни или направлении на процедуру.

Аналогичные требования сформулированы в другом нормативном документе СанПиН 2.6.1.2368-08 «Гигиенические требования по обеспечению радиационной безопасности при проведении лучевой терапии с помощью открытых радионуклидных источников» (утв. Главным государственным врачом России 16.06.2008).

Создание и функционирование приведенной системы радиационной безопасности возможно только при условии высокого профессионализма всех лиц, ответственных за назначение и проведение рентгено-радиологических процедур. Поэтому особое внимание должно уделяться обучению и информированию медицинского персонала лечебно-профилактических учреждений, пациентов и населения вопросам радиационной безопасности.

Особенности правового регулирования геномной терапии

Генетическая терапия представляет собой лечебный подход, основанный на введении в организм человека определенных генетических конструкций [4]. Генетическая терапия в России, так же как и радионуклидная, регулируется системообразующим нормативным актом в области здравоохранения — Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», а кроме того Федеральным законом от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

Согласно статье 2 Федерального закона о генно-инженерной деятельности, генотерапия представляет собой совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний.

Ранее геномная терапия рассматривалась только как возможность предотвращения наследственных заболеваний, однако теперь предлагаются новые виды

лечения с помощью изменения генотипа клеточного продукта, точно доставляемого к месту обработки (например, при лечении онкологических заболеваний к месту локализации опухоли). Терапевтический эффект при этом достигается либо экспрессией введенного гена, тогда это называется позитивной геномной терапией, либо торможением гиперэкспрессирующего или измененного гена, тогда — это негативная геномная терапия [5]. Отметим, что общие правила медицинского вмешательства применительно к геномной терапии нуждаются в уточнении.

Приоритетными принципами генно-инженерной деятельности Федеральный закон от 05.07.1996 № 86-ФЗ определяет безопасность граждан (физических лиц) и окружающей среды, безопасность клинических испытаний методов генодиагностики и геномной терапии на уровне соматических клеток, общедоступность сведений о безопасности данной деятельности. При этом данный закон не регулирует порядок осуществления генно-инженерной деятельности и применения ее методов к человеку, тканям и клеткам в составе его организма.

При анализе законодательного регулирования редактирования генома человека следует обратить внимание на то, что оно осуществляется двумя приемами: *in vivo*, когда генно-инженерные конструкции вводятся напрямую в организм человека, и *ex vivo*, когда выделенные клетки подвергаются геномной модификации вне организма человека [6]. При *in vivo* редактировании генома применяемые препараты относятся к геннотерапевтическим лекарственным препаратам и регулируются Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». При *ex vivo* модификации генома производят в культивируемых клетках человека, что относит их к биомедицинским клеточным продуктам (БМКП), которые регулируются Федеральным законом от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Отметим, что в большинстве стран мира препараты, полученные с помощью *in vivo* и *ex vivo* редактирования генома, относятся к геномной терапии.

В сфере внимания Федерального закона о биомедицинских клеточных продуктах указаны отношения, возникающие:

- в процессе разработки;
- в доклинических и клинических исследованиях;
- при экспертизе и государственной регистрации;
- в производстве, контроле качества, реализации, применении;
- при хранении, транспортировке, ввозе и вывозе из Российской Федерации;
- при уничтожении биомедицинских клеточных продуктов;
- в связи с донорством биологического материала в целях производства биомедицинских клеточных продуктов.

Таким образом, прослежен, казалось бы, весь путь клеточного материала от процесса его создания и ре-

гистрации до уничтожения. В части 2 статьи 1 данного Закона дается уточнение: перечисляются отношения, на которые действие Федерального закона не распространяется. К ним относятся: отношения, возникающие при разработке и производстве лекарственных средств и медицинских изделий, донорстве органов и тканей человека в целях их трансплантации (пересадки), донорстве крови и ее компонентов, при использовании половых клеток человека в целях применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также отношения, возникающие при обращении клеток и тканей человека в научных и образовательных целях. Данный подход по существу есть уход от решения многих спорных вопросов по регулированию, что потребует принятия еще одного специального закона. Однако это справедливо обосновывает вопрос о необходимости такого нагромождения нормативных актов, имеющих столь узкую направленность.

Поскольку биомедицинский клеточный продукт не является ни лекарственным средством, ни медицинским изделием, остается непонятным механизм его внедрения в практическое здравоохранение, так как его невозможно приобрести в аптеке или в магазинах медтехники. Каким же образом смогут получать эти продукты медицинские учреждения?

Следует отметить, что введение биомедицинского клеточного продукта в организм человека не является аналогом простого лечения, при котором лекарственный препарат может быть выведен из организма. Клеточный материал несет с собой информацию, которая не может быть предсказана на все сто процентов. Таким образом, необходимы тщательные клинические исследования, под соответствующим контролем, для того чтобы предотвратить возможные негативные последствия такой терапии. Известно, что изменения в организме развиваются постепенно, возможно, по мере накопления определенного действия, следовательно, наблюдение должно быть растянутым во времени. В рассматриваемом законодательном акте о биомедицинских клеточных продуктах впервые обозначен новый документ — информационный листок пациента, где должна быть поставлена подпись пациента, согласившегося принять участие в клинических испытаниях, и установлены лица, которые не имеют права быть объектами такого наблюдения. Эти лица — дети-сироты и дети, оставшиеся без попечения родителей; женщины в период беременности, родов, в период грудного вскармливания; военнослужащие, сотрудники правоохранительных органов; лица, отбывающие наказание в местах лишения свободы, находящиеся под стражей. Интересно, что приблизительно такой же перечень ограничений выбора пациентов для участия в клинической апробации представлен и в принятом Федеральном законе от 8 марта 2015 года № 55-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» по вопросам организации медицинской помощи, оказываемой в рам-

ках клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации.

Возвращаясь к информационному листу, следует определить, что это — документ, в котором в доступной форме изложена информация о клиническом исследовании биомедицинского клеточного продукта, его целях, плане проведения и возможных рисках, составе биомедицинского клеточного продукта и где содержится письменное добровольное согласие пациента на участие в клиническом исследовании биомедицинского клеточного продукта. Необходимо отметить, что в Федеральном законе об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации регламентируется порядок предоставления медицинской помощи, в основу которого положен принцип получения добровольного информированного согласия пациента на выбранную терапию. Однако ни один врач не сможет предсказать с достоверностью те последствия, которые могут произойти вследствие лечения пациента с помощью генетического редактирования.

Дополнительные сложности будут возникать также при применении генотерапии *in utero* (к нерожденному) [7]. Федеральный закон об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации закрепляет модель информированного согласия на любое медицинское вмешательство и не предусматривает исключений. Однако о каком информированном согласии может идти речь, когда до конца не изучены те последствия, которые влекут за собой повлечь манипуляции с генетическим материалом пациента. Кроме того, в рассматриваемом случае информированное согласие родителей по отношению к тому, кто еще не родился, не укладывается в установленный порядок. Следует учитывать, что в судебной практике не исключены иски детей-инвалидов по отношению к врачам и родителям, отказавшимся от рекомендации по искусственному прерыванию беременности.

В соответствии со статьей 25 Федерального закона № 180-ФЗ применяться могут лишь те биомедицинские клеточные продукты (БМКП), которые прошли государственную регистрацию и включены в специальный реестр. Часть 1 комментируемой статьи возлагает функцию по ведению государственного реестра БМКП на уполномоченный федеральный орган исполнительной власти, а именно Минздрав России. Этому же органу делегировано полномочие по утверждению порядка ведения государственного реестра БМКП. На основании данной нормы подготовлены приказы Минздрава России от 31.05.2017 № 281н «Об утверждении Порядка ведения государственного реестра биомедицинских клеточных продуктов» (редакция действует с 30.06.2019) и от 31.03.2017 № 141н «Об утверждении порядка ведения Государственного реестра исследователей, осуществляющих клинические исследования биомедицинских клеточных продуктов».

На сегодняшний день в мире наиболее перспективными являются высокоспецифичные системы редактирования генома технологий ZFN, TALEN и

CRISPR. Несмотря на большое количество проводимых клинических исследований, на сегодняшний день в мире ни один препарат, полученный с помощью данных технологий, не разрешен к применению, в том числе и в России. Вместе с тем в странах Европейского союза и США уже разрешены к применению 4 препарата: Strimvelis, Zalmoxis, Kymriah, Yescarta, содержащие *ex vivo* генно-модифицированные клетки человека.

При этом многие вопросы в части модификации гена человека остаются нерешенными, в том числе долгосрочная эффективность и безопасность, наличие серьезных и жизнеугрожающих побочных эффектов, наличие нецелевой (offtarget) активности [8].

Как и в лучевой и радионуклидной терапии, важным фактором широкого распространения терапии с использованием технологий редактирования генома является экономическая составляющая, связанная со сложностью технологического процесса производства, высокой стоимостью препаратов (Strimvelis — € 594 000, Yescarta — \$ 350 000, Kymriah — \$ 475 000), возможностью проведения лечения только в медицинских учреждениях, обладающих специально обученным персоналом.

Несмотря на существующие проблемы, включая отсутствие необходимого финансирования, быстрый прогресс в технологиях редактирования генома и культивирования клеток человека, в том числе и возможность появления новых технологий генной инженерии, определенные успехи в клинических исследованиях являются источником оптимизма для будущего этой области и широкого распространения новых методов генного лечения заболеваний человека. О том, что данный вид лечения является актуальным и вызывает интерес, также свидетельствуют разрабатываемые в нашей стране стратегии развития такой технологии.

Так, во исполнение указа Президента Российской Федерации «О развитии генетических технологий в Российской Федерации» 22 апреля 2019 г. принято постановление Правительства РФ № 479 «Об утверждении федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 — 2027 годы». Такая программа базируется на развитии генетических технологий, в том числе и в медицине. Кроме того, согласно Стратегии развития здравоохранения в Российской Федерации на период до 2025 года, решение основных задач развития здравоохранения в Российской Федерации должно осуществляться по таким приоритетным направлениям, как разработка и внедрение:

— современных молекулярно-генетических методов прогнозирования, диагностики и мониторинга течения заболеваний;

— новых методов регенеративной медицины, в том числе с применением биомедицинских клеточных продуктов;

— методов персонализированной фармакотерапии, включая технологии генетического редактирования и таргетную терапию.

Заключение

Как мы видим, ядерная и геномная медицины являются очень перспективными видами диагностики и лечения, однако требующими значительных финансовых затрат.

Если ядерная медицина уже стала хотя и инновационной, но довольно давно применяемой практикой лечения заболеваний, то геномная терапия, в силу неизученности последствий, представляет собой все еще некий лечебный эксперимент. При этом геномная терапия признана опережающей и приоритетной во всем мире инновационной технологией (при применении, в том числе, и стволовых клеток для лечения различных заболеваний от генетических до онкологических).

Кроме того, как уже указывалось, работа с РФЛП должна быть обеспечена защитой персонала клиники и пациентов от вредного радиационного воздействия. В то же время геномная терапия видится с данной точки зрения более безопасным методом лечения.

При этом из приведенного анализа видно, что законодательное регулирование ядерной медицины гораздо более разнообразно (нормы федерального законодательства о радиационной безопасности, санитарные нормы и правила, методические рекомендации по устройству такой терапии) по сравнению с регулированием геномной терапии.

Можно отметить, что для интенсивного освоения новых технологий необходимо увеличивать число российских лабораторий и научных групп, применяющих новые методы диагностики и лечения. Важно подготовить кадровый состав, усилить академические научные центры необходимым оборудованием и препаратами, выделив на это значительные финансовые средства, установить адекватное регулирование такой деятельности на законодательном уровне. Не на последнем месте при организации указанных видов медицины стоит необходимость разработки специальных программ повышения квалификаций врачей, а также стимулы привлечения в такие области молодых ученых.

Comparative Analysis of Legal Regulation of Nuclear and Genomic Medicine

A.S. Samoylov, E.V. Goloborodko, T.A. Astrelina, E.V. Dedova, I.V. Chukovskaya, T.V. Gubaeva

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

CONTENTS

1. Legal foundations of innovative medical activity on the examples of nuclear and genomic medicine.
2. The relevance of this topic, taking into account the current level of development of science and technology.
3. The concepts of radionuclide therapy, genomic therapy, methods of their legal regulation in Russian legislation.
4. Justification of the need to develop special standards and procedures for the provision of medical care for groups of diseases, which include the use of radiopharmaceuticals and editing the human genome.
5. Prospects for changes in law in the context of the development of genetic and nuclear technologies.

Key words: legal regulation, nuclear medicine, genomic medicine, genetic editing, biomedical technologies, radiopharmaceuticals, radionuclide therapy

For citation: Samoylov AS, Goloborodko EV, Astrelina TA, Dedova EV, Chukovskaya IV, Gubaeva TV. Comparative Analysis of Legal Regulation of Nuclear and Genomic Medicine. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):87-92 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-87-92

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ядерная медицина. Справочник для персонала отделений, лабораторий и центров ядерной медицины. Под ред. В.В. Уйба. М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, 2019. 347 с. [Nuclear medicine. Handbook for the personnel of departments, laboratories and centers of nuclear medicine. Ed. by VV Uyba. M.: SRC-FMBC, 2019. 347 p. (In Russ.).]
2. Романовский Г.Б. Правовое регулирование ядерной медицины. Электронный научный журнал «Наука. Общество. Государство». 2017;5(1). [Romanovskiy GB. Legal regulation of nuclear medicine. Electronic scientific journal "Science. Society. State." 2017;5(1). (In Russ.).]
3. Методические рекомендации «Защита населения при назначении и проведении рентгенологических исследований», утвержденные Минздравом России 06.02.2004 № 11-2/4-09.
4. Романовский Г.Б. Правовое регулирование генетических исследований в России и Германии. Правозащитник. 2016;2:5. [Romanovskiy GB. Legal regulation of nuclear medicine. Human Rights Defender. 2016;2:5. (In Russ.).]
5. Этика геномики: материалы конференции «Геном человека — 1999». Человек. 1999. № 4–5. [Ethics of genomics: proceedings of the conference «Human Genome – 1999». Man. 1999. No. 4-5. (In Russ.).]
6. Горяев АА, Савкина МВ, Мефед КМ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Тарасов ВВ. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):141. [Goryaev AA, Savkina MV, Mefed KM, Bondarev VP, Merkulov VA, Tarasov VV. Genome Editing and Biomedical Cell Products: Current State, Safety and Efficiency. Biologicals. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):141. (In Russ.).]
7. Heather A, Avery C, William H. In Utero Gene Therapy and Genome Editing. Current Stem Cell Reports. 2018;4(7573):1-9.
8. Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T-cell therapy progress and prospects. Hum Gene Ther Methods. 2017;28(2):61-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14020.

Financing. This work has been supported by RFBR, project No. 18-29-14020.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 04.11.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 04.11.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Samoylov A.S. <https://orcid.org/0000-0002-9241-7238>.

Goloborodko E.V. <https://orcid.org/0000-0002-5124-6954>.

Astrelina T.A. <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>.

Dedova E.V. <https://orcid.org/0000-0001-9466-9335>.

Chukovskaya I.V. <https://orcid.org/0000-0003-4207-9952>.

Gubaeva T.V. <https://orcid.org/0000-0001-8719-778X>.