

## ИЗУЧЕНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ РАДИАЦИОННЫХ АВАРИЙ

УДК 612.112.94: 576.3:614.876:539.1.047:57.087

### МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОЗИМЕТРИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОБЛУЧЕНИИ, ОСНОВАННЫЙ НА ОЦЕНКЕ УРОВНЯ CD3+CD4<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ

© 2020 г. С. В. Осовец<sup>1</sup>, В. Л. Рыбкина<sup>1</sup>, Т. В. Азизова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Южно-Уральский институт биофизики ФМБА России, Озёрск, Россия

\*E-mail: clinic@subi.su

Поступила в редакцию 15.05.2019 г.

После доработки 20.09.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Для разработки метода биологической дозиметрии были использованы результаты обследования 39 человек — бывших работников ПО “Маяк”, подвергшихся хроническому внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения в течение трудовой деятельности. В качестве базовой математической модели для расчета накопленных доз  $\gamma$ -излучения использовали экспоненциальную зависимость “CD3+CD4<sup>+</sup> лимфоциты—поглощенная доза”. Показано, что рассчитанные по экспоненциальной модели дозы хорошо согласуются с индивидуальными дозами для работников ПО “Маяк”, ранее определенными методом физической дозиметрии. Выявленная зависимость может быть использована в дальнейшем как калибровочная кривая для расчета оценок поглощенных доз при хроническом внешнем воздействии  $\gamma$ -излучения у работников атомной промышленности.

**Ключевые слова:** биологическая дозиметрия, биомаркер, Т-хелперы (CD3+CD4<sup>+</sup>), внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения, экспоненциальная зависимость, калибровочная кривая

**DOI:** 10.31857/S0869803120030091

Несмотря на то что биодозиметрия, основанная на данных цитогенетических исследований, по-прежнему остается “золотым стандартом” биодозиметрии [1], в настоящее время предлагается большое количество молекулярно-генетических, белковых, метаболических, клеточных биомаркеров облучения, которые могут быть пригодны для биодозиметрии [2]. Среди клеточных биомаркеров воздействия ионизирующих излучений особое внимание уделяется исследованиям субпопуляций лимфоцитов, определение которых стало возможным благодаря достижениям в области проточной цитофлюориметрии.

Так, на культурах лимфоцитов человека была установлена обратная линейная зависимость экспрессии кластеров дифференцировки лимфоцитов, характеризующих их функции (CD8<sup>+</sup> естественных киллеров, CD27<sup>+</sup>В-лимфоцитов) от дозы внешнего облучения [3, 4]. Предпринимались попытки исследовать профиль экспрессии генов *GADD45*, *CDKN1A*, *DDB2*, *PCNA*, *BAX* и *ATF3* в общей популяции лимфоцитов и в CD3+CD4<sup>+</sup> субпопуляции. Так, в эксперименте с воздействием  $\gamma$ -излучения на мононуклеарные клетки крови *in vitro* рассматриваемая зависимость доза—эффект характеризовалась наибольшим коэффициентом корреляции для общей популяции лим-

фоцитов [5]. Комбинация поверхностного иммунофенотипирования вместе с внутриклеточной детекцией фокусов фосфорилирования H2AX использовалась для оценки доз внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения. Лимфоциты периферической крови человека облучали в дозах 0–10 Гр. Все три исследованные субпопуляции лимфоцитов демонстрировали линейную дозовую зависимость, однако CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоциты экспрессировали фокусы фосфорилированного H2AX в 1.5 раза сильнее, чем CD19<sup>+</sup> лимфоциты. По мнению авторов [6] этот метод может быть использован лишь для биоиндикации, а не для биодозиметрии из-за высоких индивидуальных различий показателей.

Результаты исследований жителей Хиросимы и Нагасаки, выживших после атомной бомбардировки (дозы острого облучения от 0 до 5.6 Гр), проведенных через 50–65 лет после воздействия радиации, показали зависимость от дозы снижение относительного содержания CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>CD45Ra<sup>+</sup> наивных Т-хелперов и CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> наивных Т-киллеров. В то же время относительное содержание CD8<sup>+</sup> клеток памяти и CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup> — регуляторных Т-клеток CD4<sup>+</sup> в популяции повышалось с увеличением дозы облучения [7].

Исследовано состояние иммунитета и биомаркеров действия радиации у работников ПО “Маяк”, подвергшихся внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения (0.47–5.09 Гр) и внутреннему облучению ( $\alpha$ -частицы) от инкорпорированного плутония (0.01–1.01 Гр на красный костный мозг (ККМ)). Продемонстрировано зависимое от дозы внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения снижение абсолютного содержания  $CD3^+$  Т-лимфоцитов и зависимое от дозы внутреннего облучения ККМ ( $\alpha$ -частицы) повышение относительного содержания НКТ-лимфоцитов [8]. Все вышеупомянутые исследования свидетельствуют о возможности использования анализа субпопуляционного состава лимфоцитов для биоиндикации и биодозиметрии ионизирующих излучений.

Следует также отметить, что принципиальное отличие биологической и физической дозиметрии заключается в том, что последняя исходит из физических характеристик облучения и, на основании измерений с последующим использованием дозиметрических моделей, дает усредненную или индивидуальную дозу облучения, в то время как биологическая дозиметрия основывается на анализе последствий (эффектов) радиационного воздействия на организм. Таким образом, биодозиметрический подход изначально имеет индивидуализированный характер, так как эффект радиационного воздействия опосредован специфическими характеристиками организма, включая индивидуальную радиочувствительность.

Целью настоящего исследования была разработка метода биологической дозиметрии на основе зависимости “ $CD3+CD4^+$  лимфоциты—поглощенная доза” для последующей оценки индивидуальных доз хронического внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения у работников атомного производства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В настоящее исследование было включено 39 человек — бывших работников ПО “Маяк”, подвергшихся в течение трудовой деятельности хроническому воздействию внешнего  $\gamma$ -излучения в диапазоне доз от 0.23 до 2.35 Гр (среднее — 0.90 Гр, медиана — 0.73 Гр, стандартное отклонение — 0.47 Гр). Распределение по половому составу: четыре женщины (~10%) и 35 мужчин (~90%). Средний возраст обследованных составил  $82.2 \pm 0.9$  лет, медиана 79.8 лет, стандартное отклонение 5.6 лет.

В исследовании были использованы оценки индивидуальных поглощенных доз, полученные и рассчитанные на основе дозиметрической системы работников ПО “Маяк” (MWDS), созданной в рамках российско-американского сотрудничества [9]. В исследование не включены лица, у которых на момент обследования были зарегистрированы злокачественные новообразования,

аутоиммунные и аллергические заболевания, острые воспалительные процессы и хронические заболевания в стадии обострения. Проект одобрен Наблюдательным советом по защите прав граждан, привлекаемых в качестве субъекта исследования в научно-исследовательских программах ФГУП ЮУрИБФ ФМБА России. Все включенные в исследование лица подписали “Информированное согласие на добровольное участие в исследовании” и “Согласие на обработку персональных данных”.

В качестве биомаркера хронического внешнего облучения было использовано относительное содержание Т-хелперов ( $CD3+CD4^+$  — основной фенотипический признак Т-хелперов, т.е. Т-лимфоцитов, главной функцией которых является усиление адаптивного иммунного ответа).

Уровень экспрессии мембранных белков  $CD3+CD4^+$  (кластеров дифференцировки) оценивался по относительному количеству Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), с использованием метода точной цитофлюориметрии [10].

Для проведения исследований методом точной цитофлюориметрии у привлеченных лиц был проведен сбор крови в количестве 5 мл от каждого человека в пробирки с литий-гепарином (“Sarstedt”, Германия). Затем в пробирку для цитометрического анализа помещали раствор моноклональных антител, меченных флуорохромом (BeckmanCoulter, США), в количестве 10 мкл; после этого добавляли 100 мкл образца периферической крови; перемешивали при помощи вихревого встряхивателя и инкубировали в защищенном от света месте в течение 30 мин; проводили лизис эритроцитов при помощи лизирующих растворов. Кластеры дифференцировки лимфоцитов  $CD3+CD4^+$  были проанализированы на точном цитофлюориметре EPICS XL (BeckmanCoulter, США) и автоматической рабочей станции Q-PREP (BeckmanCoulter, США).

В качестве базовой математической модели для построения калибровочной кривой зависимости  $CD3+CD4^+$ -лимфоцит—поглощенная доза внешнего  $\gamma$ -излучения использовали экспоненциальную зависимость:

$$y = y_0 \exp(-bD), \quad (1)$$

где  $y$  — показатель  $CD3+CD4^+$ , %;  $y_0$  —  $CD3+CD4^+$  при  $D = 0$ ;  $D$  — поглощенная доза внешнего излучения (Гр).

Помимо базовой экспоненциальной модели, описывающей зависимость “ $CD3+CD4^+$ —поглощенная доза” на имеющихся данных были предварительно протестированы линейная модель вида  $y = a - bD$  и степенная модель вида  $y = \alpha D^{-\beta}$ , которые показали по сравнению с экспоненци-

альной моделью менее точное качество аппроксимации эмпирического материала.

Параметры экспоненциальной модели, после предварительной ее линеаризации, оценивали стандартным методом наименьших квадратов (МНК), а также методом ортогональной регрессии [11]. Для расчетов использовали стандартные программы STATISTICA и MathCAD.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для расчета параметров экспоненциальной модели (1) методами НК и ортогональной регрессии сначала линеаризировали данную зависимость, логарифмируя обе ее части. В результате получили линейную зависимость:

$$Y = A - BD, \quad (2)$$

где  $Y = \ln(y)$ ,  $A = \ln(y_0)$  и  $B = b$ .

Методом наименьших квадратов была получена линейная регрессия следующего вида:

$$Y = (4.109 \pm 0.028) - (0.329 \pm 0.028)D. \quad (3)$$

Расчеты методом ортогональной регрессии [11, 13] дали приблизительно такой же результат:

$$Y = (4.117 \pm 0.025) - (0.338 \pm 0.024)D. \quad (4)$$

Обе регрессионные модели (3) и (4) с эмпирическими точками представлены на рис. 1.

Из рисунка видно, что обе регрессионные прямые (метод НК – сплошная линия; метод ортогональной регрессии – пунктирная линия) очень близко аппроксимируют эмпирические данные.

Однако необходимо отметить, что по критерию  $S^2$  (сумма квадратов отклонений эмпирических значений от расчетных величин), который характеризует качество аппроксимации, метод ортогональной регрессии дал более точные (~ на 10%) результаты по сравнению с обычным методом НК:  $S_{\text{от}}^2 = 0.219$  и  $S_{\text{нк}}^2 = 0.243$ . Помимо этого, в методе ортогональной регрессии прямая и обратная регрессия (в отличие от метода НК) совпадают между собой, что является существенным методологическим моментом в биологической дозиметрии [13].

Обе регрессии статистически значимы по  $F$ -критерию Фишера, а их параметры значимы по  $t$ -критерию ( $p < 0.05$ ). Коэффициент детерминации ( $R^2$ ) составил величину ~0.79. Таким образом, найдена статистически значимая экспоненциальная модель, которая позволяет получить из формулы (4) калибровочную кривую для оценки поглощенных доз внешнего  $\gamma$ -излучения методом биологической дозиметрии:

$$D_p = (12.180 \pm 0.074) - (2.958 \pm 0.211)Y, \quad (5)$$

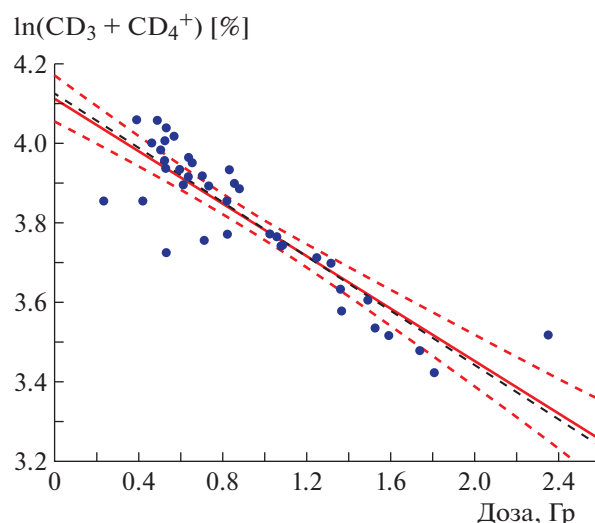


Рис. 1. Регрессионные зависимости CD3+CD4<sup>+</sup> лимфоциты–поглощенная доза.

Fig. 1. Regression CD3+CD4<sup>+</sup> levels–absorbed dose relationships.

где  $D_p$  – поглощенная доза (Гр), рассчитанная методом биологической дозиметрии;  $Y = \ln(\text{CD3} + \text{CD4}^+ \%)$ .

В табл. 1 представлены сравнительные результаты расчетов поглощенных доз по зависимости (5) и доз, определенных физическим методом.

Из табл. 1, при сравнении  $D_{\text{ф}}$  и  $D_p$ , видно, что дозы, рассчитанные с помощью зависимости (5), хорошо согласуются с эмпирическими дозами,

Таблица 1. Сравнение поглощенных доз внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения, полученных физическим методом ( $D_{\text{ф}}$ , Гр) и методом биологической дозиметрии ( $D_p$ , Гр)  
Table 1. Comparison between absorbed doses from gamma rays estimated with the physical dosimetry ( $D_{\text{ph}}$ , Gy) and with the biosdosimetry technique ( $D_{\text{est}}$ , Gy)

$N$	$D_{\text{ф}}$	$D_p$	$N$	$D_{\text{ф}}$	$D_p$	$N$	$D_{\text{ф}}$	$D_p$
1	1.530	1.568	14	1.025	1.009	27	1.593	1.618
2	1.810	1.842	15	0.831	0.621	28	0.635	0.546
3	1.490	1.406	16	1.058	1.026	29	1.310	1.181
4	2.350	1.611	17	1.251	1.146	30	1.031	1.009
5	0.820	1.009	18	0.566	0.417	31	0.708	0.654
6	1.370	1.466	19	0.535	1.117	32	0.461	0.461
7	0.390	0.324	20	0.531	0.366	33	0.598	0.616
8	0.420	0.807	21	0.632	0.663	34	0.505	0.501
9	0.710	1.042	22	0.858	0.702	35	0.611	0.712
10	1.740	1.705	23	1.079	1.076	36	0.522	0.565
11	0.820	0.807	24	1.355	1.341	37	0.730	0.722
12	0.486	0.324	25	0.649	0.579	38	0.517	0.448
13	0.231	0.807	26	0.884	0.732	39	0.527	0.607

полученными физическим методом для работников ПО “Маяк”. Таким образом, задача построения калибровочной кривой для оценки поглощенных доз хронического внешнего облучения в первом приближении решена.

Оценка относительной погрешности оценки индивидуальных поглощенных доз хронического воздействия внешнего  $\gamma$ -излучения является отдельной и непростой задачей. Предварительные расчеты показывают, что в среднем такая ошибка составит  $\sim 50$ – $60\%$ . Это приблизительно в 2 раза меньше таковой, имеющей место при применении цитогенетического метода биологической индикации и дозиметрии, который использовался нами для аналогичных данных по хроническому облучению работников ПО “Маяк” [12, 13].

В дополнение к настоящему исследованию можно отметить, что снижение относительного содержания  $CD3+CD4^+$ -лимфоцитов также наблюдали у жителей прибрежных сел р. Теча через 53–56 лет после начала хронического облучения [14, 15], но значимых зависимостей доза–эффект в этих исследованиях не выявлено. Сравнение наших результатов по хроническому внешнему облучению работников ПО “Маяк” с исследованием снижения относительного содержания  $CD3+CD4^+$ -лимфоцитов при остром внешнем воздействии радиации на жителей Хиросимы и Нагасаки, которое было проведено спустя 40–50 лет после атомной бомбардировки [16], вряд ли является корректным в рамках настоящего исследования. Следует также отметить, что данный метод, как и подавляющее большинство биомаркеров, не является специфичным для радиационного воздействия. В дальнейшем, после завершения цитогенетических исследований для рассмотренного в данной работе контингента работников ПО “Маяк” (39 человек), предполагается использование комплексного подхода к биологической дозиметрии хронического внешнего  $\gamma$ -излучения, в какой-то мере по аналогии с ранее предложенным методом оценки аварийных доз внешнего облучения [17].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе экспоненциальной зависимости  $CD3+CD4^+$ –поглощенная доза разработан метод биологической дозиметрии для последующей оценки индивидуальных доз суммарного хронического внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения работников ПО “Маяк”. В первом приближении получена калибровочная кривая. Рабочий диапазон поглощенных доз внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения, оцениваемых предложенным методом, составляет от 0 до 2.5 Гр. Сравнение доз, полученных физическим методом и методом биоло-

гической дозиметрии, показало хорошее соответствие между обоими методами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельников С.Б. Биологическая дозиметрия: Теоретические и практические аспекты. Минск: Белорусский комитет “ДзеціЧарнобыля”, 2002. 192 с. [Mel'nikov S.B. Biologicheskaya dozimetriya: teoreticheskie i prakticheskie aspekty. Minsk: Belorusskiy komitet Deti Chernobylya, 2002. 192 p. (In Russian)]
2. BioDose-2008: The 8th International Symposium on EPR Dating and Dosimetry and 3rd Joint International Conference on Biodosimetry // Health Phys. 2010. V. 98. № 2. P. 93–457.
3. Vokurkova D., Sinkora J., Vavrova J., Rezacova M., Knizek J., Ostereicher J. CD8+ Natural Killer Cells Have a Potential of a Sensitive and Reliable Biodosimetric Marker in vitro // Physiol. Res. 2006. V. 55. P. 689–698.
4. Rehakova Z., Sinkora J., Vlkova M., Vokurkova D., Ostereicher J., Vavrova J., Driak D. CD27+ Peripheral Blood B-cells Are a Useful Biodosimetric Marker in vitro // Physiol. Res. 2008. V. 57. P. 589–600.
5. Riecke A., Rufa C.G., Cordes M. et al. Gene expression comparisons performed for biodosimetry purposes on in vitro peripheral blood cellular subsets and irradiated individuals // Radiat. Res. 2012. V. 178. № 3. P. 234–243.
6. Andrievski A., Wilkins R.C. The response of c-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures // J. Radiat. Biol. 2009. V. 85. № 4. P. 369–376.
7. Yamaoka M., Kusunoki Y., Kasaki F. et al. Decreases in percentages of naive CD4 and CD8 T cells and increases in percentages of memory CD8 T cell subsets in the peripheral blood lymphocyte populations of A-bomb survivors // Radiat. Res. 2004. V. 161. № 3. P. 290–298.
8. Rybkina V.L., Bannikova M.V., Adamova G.V. et al. Immunological markers of chronic occupational radiation exposure // Health Phys. 2018. V. 115. № 1. P. 108–113.
9. Vasilenko E.K., Khokhryakov V.F., Miller S.C. et al. Mayak Worker Dosimetry Study: An Overview // Health Phys. 2007. V. 93. № 3. P. 190–206.
10. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Hajdukov S.V., Kudryavcev I.V., Chereshevnev V.A. Protochnaya citometriya v medicine i biologii. Ekaterinburg: RIO UrO RAN, 2013. 552 p. (In Russian)]
11. Крамер Г. Математические методы статистики. М.: Мир, 1975. 648 с. [Kramer G. Matematicheskie metody statistiki. M.: Mir, 1975. 648 p. (In Russian)]
12. Osovets S.V., Sotnic N.V., Meineke V. et al. Threshold limits for exposure using mFISH // Health Phys. 2014. V. 106. № 6. P. 677–681.
13. Осовец С.В., Сотник Н.В., Азизова Т.В. и др. Возможности и ограничения биологической индикации и дозиметрии хронического облучения // Вопр. радиац. безопасности. 2015. № 1. С. 37–46. [Osovets S.V., Sotnik N.V., Azizova T.V. i dr. Vozmozhnosti

- i ogranicheniya biologicheskoy indikacii i dozimetrii hronicheskogo oblucheniya // Voprosy radiacionnoj bezopasnosti. 2015. № 1. p. 37–46. (In Russian)]
14. *Овчарова Е.А.* Влияние низкоинтенсивного хронического радиационного воздействия на показатели иммунитета жителей прибрежных сел реки Теча в отдаленные сроки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 21 с. [*Ovcharova E.A.* Vliyaniye nizkointensivnogo hronicheskogo radiacionnogo vozdeystviya na pokazateli immuniteta zhitelej pribrezhnyh sel reki Techa v otdalennyye stroki: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. M.: 2006. 21 p. (In Russian)]
  15. *Аклеев А.В.* Иммуный статус лиц, подвергшихся хроническому облучению // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2007. Т. 52. № 3. С. 5–9. [*Akleev A.V.* Immunnyj status lic, podverghshihya hronicheskomu oblucheniyu // Med. radiologiya i radiac. bezopasnost'. 2007. V. 52. № 3. P. 5–9. (In Russian)]
  16. *Kusunoki Y., Kyojumi S., Hirai Y., Suzuki T., Nakashima E., Kodama K., Seyama T.* Flow Cytometry Measurements of Subsets of T, B NK Cells in Peripheral Blood Lymphocytes of Atomic Bomb Survivors // Radiat. Res. 1998. V. 150. P. 227–236.
  17. *Осовец С.В., Азизова Т.В., Василенко Е.К.* Метод биологической дозиметрии для оценки аварийных доз внешнего облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 12–17. [*Osovets S.V., Azizova T.V., Vasilenko E.K.* Metod biologicheskoy dozimetrii dlya ocenki avarijnyh doz vneshnego oblucheniya // Radiac. biologiya. Radioekologiya. 2017. V. 57. № 1. P. 12–17. (In Russian)]

## Biodosimetry technique based on CD3+CD4<sup>+</sup> Lymphocyte Levels for Assessment of Chronic Radiation Exposure

S. V. Osovets<sup>a</sup>, V. L. Rybkina<sup>a</sup>, and T. V. Azizova<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> Southern Urals Biophysics Institute affiliated at the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Ozyorsk, Russia

<sup>#</sup>E-mail: clinic@subi.su

39 former workers of the Mayak PA who had been occupationally exposed to gamma rays over prolonged periods were involved in the study aimed to develop a technique for biological dosimetry. An exponential relationship “CD3+CD4<sup>+</sup> level–absorbed radiation dose” was set as a basic mathematical model for estimation of external exposure doses from gamma rays. The study demonstrated that doses estimated with the exponential model were consistent with individual doses that had been estimated with a physical dosimetry method for Mayak PA workers earlier. The observed relationship may be used as a calibration curve for estimation of absorbed doses of chronic external exposure from gamma rays accumulated by nuclear workers.

**Keywords:** biological dosimetry, T-helpers (CD3+CD4<sup>+</sup>), external  $\gamma$ -ray exposure, exponential relationship, calibration curve