

УДК [599:539.1.047]:576.32/36:616:42

²³⁹Pu: КЛИНИКО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ ВЫСОКОЙ ИНКОРПОРАЦИИ РАДИОНУКЛИДА (24 ГОДА НАБЛЮДЕНИЯ)

© 2004 г. Н. Д. Окладникова, В. В. Хохряков, В. А. Шевкунов*,
В. С. Пестерникова, А. Е. Щадилов

*Южно-Уральский институт биофизики МЗ РФ Озерск, Россия
Центр профессиональной лучевой патологии, Озерск, Россия*

Описан случай поступления в организм через травмированную кожу большого количества растворимого соединения ²³⁹Pu с преимущественным депонированием в скелете и соответственно высокими дозами хронического α-излучения на красный костный мозг. Представлены характер формирования поглощенной дозы во времени, состояние органов и систем на протяжении 24 лет наблюдения, особенности повреждения генома соматических клеток по тесту хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови. В отдаленном периоде клинического наблюдения выявлена высокая частота ХА. Показано, что для плотноионизирующего α-излучения характерны сложные симметричные и асимметричные хромосомные обмены, мультиабберрантные клетки (МА).

²³⁹Pu, внутреннее облучение, состояние здоровья, лимфоциты, хромосомные aberrации, мультиабберрантные клетки.

²³⁹Pu многие годы привлекает внимание радиобиологов и специалистов в области радиационной медицины как фактор высокого онкогенного риска, который доказан многочисленными экспериментальными исследованиями на разных видах животных и клиническими наблюдениями. В условиях современного производства по переработке отработавшего ядерного топлива система мероприятий по коллективной и индивидуальной противорадиационной защите работающих практически исключает случаи хронического поступления ²³⁹Pu. Тем не менее в результате несчастных случаев радионуклид может поступить в организм. Наряду с наиболее распространенным ингаляционным путем поступления плутония в организм человека сохраняется опасность поступления его через травмированные кожные покровы [1–5]. Описание каждого случая дает новую информацию для совершенствования системы диагностических и лечебных мероприятий, дозиметрии, биоиндикации, прогнозирования ближайших и отдаленных последствий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализированы и обобщены результаты многолетнего наблюдения за работником, полу-

чившим поступлением радионуклида в организм. Начальное содержание в ране составило 59.2 кБк. Поступление в организм, рассчитанное по результатам последующих систематических измерений содержания плутония в моче (оценка по данным естественной экскреции радионуклида с мочой), составило 83.6 кБк. Основным органом депонирования радионуклида был скелет, в результате максимальные поглощенные дозы внутреннего облучения пришлось на красный костный мозг. Оценка поступления ²³⁹Pu и поглощенных доз проведена в соответствии с работой [6]. Кратко описаны основные этапы деконтаминации, результаты ежегодных клинических исследований, направленных на выявление детерминированных и стохастических эффектов инкорпорации радионуклида, состояние генома соматических клеток по тесту хромосомных aberrаций [ХА] в лимфоцитах периферической крови в сопоставлении с поглощенными дозами на красный костный мозг. Использован стандартный метод культуры лимфоцитов периферической крови. Лимфоциты культивировали в течение 48–52 ч. Колхицин в количестве 0.5 мкг на 1 мл среды добавляли за 4 ч до окончания культивирования, достигая накопления митозов в первом делении клетки *in vitro*. Для гипотонической обработки клеток использовали раствор цитрата натрия (0.9%), для фиксации – смесь ледяной уксусной кислоты с метанолом в соотношении 3 : 1. Хромосомные препараты готовили путем нанесения капли клеточной

*Адресат для корреспонденции: 456780 Озерск, Челябинская обл., Озерское ш., 19, Южно-Уральский институт биофизики; тел.: (35171) 7-54-65; факс: (35171) 7-25-50; e-mail: pesternikova@fiblko.chel-65.chel.su.

взвеси на охлажденные предметные стекла. Анализировали все типы хроматидных и хромосомных aberrаций. Оценивали количество aberrаций на 100 проанализированных метафазных пластинок. На каждый срок исследования анализировали от 100 до 135 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

М., 28 лет, работник радиохимического производства, 25.01.69 г. при выполнении ремонтной работы травмировал второй палец левой кисти острым предметом, "загрязненным" плутонием-239. Локальная радиометрия показала высокое содержание радионуклида в ране (более 59.2 кБк). При первичной хирургической обработке под местным обезболиванием иссечены размозженные ткани с дополнительным выскабливанием жировой клетчатки по ходу раневого канала. При контрольной радиометрии установлено удаление значительной части активности (4.5×10^4 Бк). Повторное оперативное вмешательство было ограничено иссечением лишь поверхностных тканей в окружности раны и выскабливанием раневого канала, так как имелась опасность повреждения сухожилия, под которым находился канал. Активность удаленного детрита составила 0.4×10^4 Бк. Оставалась необходимость более радикального оперативного вмешательства с возможным иссечением сухожилия. Несмотря на уговоры хирургов, врачей-профпатологов, доведение до пострадавшего всех результатов радиометрических измерений и обоснованных опытом и научными фактами возможных опасных последствий инкорпорации ^{239}Pu , пациент категорически отказался от повторного оперативного вмешательства и делал это в дальнейшем многократно с редким упорством, не объясняя свое решение. Проводились повторные курсы лечения пентацином (5%-ный раствор в/в) как в стационаре, так и в амбулаторных условиях. Через 9 лет после травмы (1978 г.) на участке травмы образовалась трофическая язва. Пострадавший дал согласие на оперативное лечение. Проведено широкое иссечение жировой клетчатки, сухожильного влагалища, межфаланговой суставной сумки. От ампутации пальца больной вновь категорически отказался. При контрольной радиометрии установлено, что радионуклид распространился на весь палец. На травмированном участке развились выраженные трофические изменения кожи, тугоподвижность фаланг, затем контрактура, межфаланговый артрит и медленно заживающие трофические язвы. Проводилось как местное, так и общее лечение, направленное на ускорение репаративных процессов. В 1993 г. М. утонул в озере. Была произведена аутопсия. По данным посмертного радиометрического измерения органов, содержание радионуклида в организме составило 43.47 кБк, с

депонированием преимущественно в скелете (в легких и трахеобронхиальных узлах – 0.7%). Период клинического наблюдения после травмы достиг к 1993 г. 24 лет. За это время пострадавший многократно госпитализировался в специализированное отделение для лечения последствий травмы и комплексного медицинского обследования с учетом высокого содержания ^{239}Pu в организме.

По данным предварительного перед поступлением на работу медицинского осмотра (1964 г.), М. не имел противопоказаний для работы с источниками ионизирующего излучения. Активных жалоб не предъявлял. В анамнезе: малярия и ангина в раннем детском возрасте. При медицинском осмотре выявлены симптомы хронического холецистита вне обострения. Количество лейкоцитов в периферической крови при трехкратном исследовании колебалось в пределах $4.1\text{--}5.2 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилов – $2.44\text{--}3.16 \times 10^9/\text{л}$, лимфоцитов – $1.44\text{--}2.65 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов – $200\text{--}264 \times 10^9/\text{л}$. Показатели красной крови были нормальные. После травмы и оперативных вмешательств локальные изменения второго пальца левой кисти прогрессировали: трофические изменения кожи с образованием трещин, изъязвлений, развитие анкилоза межфаланговых суставов. Местное лечение было эффективным. Общее состояние оставалось удовлетворительным. При периодических медицинских осмотрах регистрировались жалобы астенического характера, симптомы хронического холецистита, остеохондроза поясничного отдела позвоночника с умеренным болевым синдромом и редкими обострениями, периодически – острые респираторные заболевания. Систематическое биофизическое исследование показало системное накопление плутония преимущественно в скелете. Рисунок 1 характеризует динамику накопления поглощенной дозы на красный костный мозг.

К концу наблюдения поглощенная доза на красный костный мозг составила 2.73 Гр. Учитывая большую дозовую нагрузку на красный костный мозг, при клиническом наблюдении особое внимание было уделено оценке состояния кровотока.

Ежегодные исследования периферической крови не выявили отклонения показателей красной крови в течение всего периода наблюдения. Количество тромбоцитов находилось стабильно в диапазоне значений $220\text{--}280 \times 10^9/\text{л}$. Показатели лейкоцитов отличались некоторой неустойчивостью. Сохранялась тенденция к лейкопении, как это было отмечено при повторных исследованиях крови в период до травмы (рис. 2).

Большинство значений количества лейкоцитов находилось в пределах $4.2\text{--}5.1 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилов – $3.3\text{--}2.8 \times 10^9/\text{л}$, лимфоцитов – $2.0\text{--}1.5 \times 10^9/\text{л}$.

Исследование костного мозга, полученного при стеральной пункции в 1990 г. (поглощенная доза на красный костный мозг 2.48 Гр), выявило высокое содержание клеточных элементов (207200 в 1 мм^3) за счет выраженной активации эритропоэза. Среди гранулоцитов преобладали пролиферирующие формы: индекс созревания нейтрофилов – 1.1, в норме – 0.6–0.8. Эти изменения свидетельствовали о компенсаторном характере процессов, происходящих в костном мозге при сохраняющейся нестойкой умеренной лейкопении в периферической крови.

Проведенное через 8 мес. после травмы цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови не выявило хромосомных aberrаций (ХА) в 100 проанализированных метафазных пластинках (рис. 1, сплошная линия). 9 клеток содержали хроматидные нарушения (пробелы – 8, одиночный фрагмент – 1). В 1978–1980 гг. при трехкратном исследовании выявлялось от 1 до 4 ХА на 100 клеток (дидцентрики с сопутствующими фрагментами, атипичные моноцентрики). При четырехкратном исследовании в 1990–1992 г. было обнаружено стабильно высокое содержание симметричных и асимметричных хроматидных обменов (от 36 до 63 aberrаций хромосомного типа на 100 анализируемых метафазных пластинок) – см. рис. 1. При всех цитогенетических исследованиях выявляли как нестабильные, так и стабильные ХА. Основную долю нестабильных ХА составили дидцентрические хромосомы с сопутствующими фрагментами, единичные трицентрики и центрические кольца. Так, при анализе 459 метафазных пластинок (исследование 1990–1991 гг.) было выявлено 55 дидцентриков и трицентриков, один квадрицентрик, т.е. 12.2 на 100 клеток. Соответствующий показатель для свободно лежащих парных ацентрических фрагментов составил 8.7, для интерстициональных делеций – 4.8, так называемых “minutes” – 1.5. Большинство (84%) дидцентриков, полицентриков и кольцевых хромосом имели сопутствующие парные фрагменты. В разные сроки исследования ХА стабильного типа составляли 25–50% от общего количества обнаруженных ХА. Мы называем их здесь атипичными моноцентриками, так как рутинный метод не позволил точно определить их генез даже при групповом кариотипировании хромосомного набора в каждой метафазной пластинке. Частота стабильных ХА на последний срок наблюдения составила 16.3 на 100 клеток. К концу наблюдения при поглощенной дозе на красный костный мозг 2.69 Гр в 269 клетках было выявлено 128 симметричных и асимметричных хромосомных обменов, т.е. 47.6 aberrаций на 100 клеток (см. рис. 1), из которых половину составили aberrации стабильного типа. К концу наблюдения (1990–1992 гг.) появились клетки с большим количеством ХА. Из 459 проанализированных метафазных пластинок 16 кле-

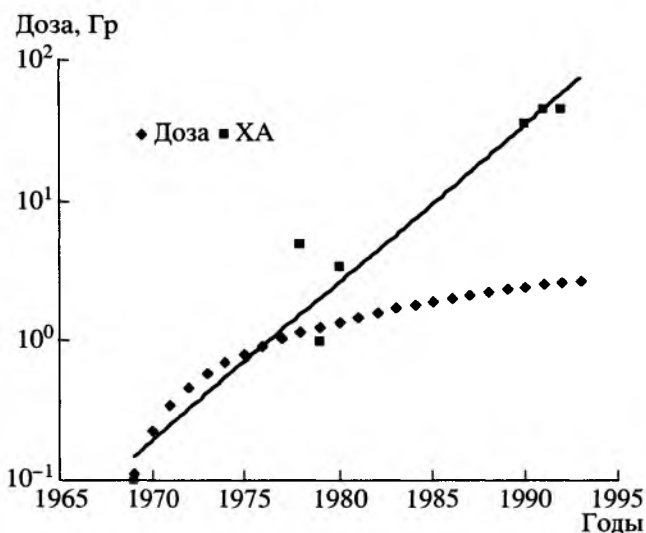


Рис. 1. Динамика накопления поглощенной дозы на красный костный мозг и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови.



Рис. 2. Количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в динамике: 1 – лейкоциты, 2 – нейтрофилы, 3 – лимфоциты.

ток содержали 3 и более ХА (3.49%), из них 10 клеток содержали 4–13 ХА (2.18%). Частота “нагруженных” aberrациями так называемых мультиаберрантных клеток была на два порядка выше спонтанной [7–9]. В таблице представлены виды aberrаций в мультиаберрантных клетках.

Таким образом, при высоком уровне инкорпорации ^{239}Pu с накоплением поглощенной дозы на красный костный мозг увеличивается нестабильность генома, выявляемая по тесту ХА в лимфоцитах периферической крови. Ранее как в экспериментальных, так и клинических исследованиях показан генотоксический эффект разных α -излучателей, в том числе и ^{239}Pu . Известно, что α -излучение вызывает множественные разрывы ДНК, приводя к сложным меж- и внутрихромосомным, меж- и внутрихроматидным обменов. Проведенное исследование подтвердило высокий

Хромосомные aberrации в мультиабберрантных клетках

Но- мер	Число ХА в клетке	В том числе					
		парные фрагменты	интерсти- циальные делеции	дидентрики (+фр.)	трицентрики (+фр.)	кольцевые хромосомы	атипичные момоцентрики
1	4	-	-	1	-	-	3
2	13	9	-	1	-	-	3
3	7	4	3	-	-	-	-
4	4	-	-	3	-	-	1
5	4	-	-	2	-	-	2
6	5	-	-	1	-	-	4
7	4	-	-	1	-	2	1
8	5	-	1	-	2	-	2
9	5	1	-	-	-	-	4
10	4	-	-	-	-	-	4

генотоксический эффект этого радионуклида и в дополнение к предыдущим исследованиям [9–13] продемонстрировало роль α -излучения в индукции хромосомных обменов, ведущих к образованию как сложных по генезу стабильных [14], так и нестабильных aberrаций, мультиабберрантных клеток. Вопрос о происхождении и роли МА до сих пор дискутируется [7–9]. В ранних исследованиях α -излучение рассматривалось как один из многих возможных этиологических факторов происхождения МА (разные виды ионизирующего излучения, химические соединения, вирусы и др.). Предполагаемая роль α -излучения пока не находила подтверждения. Описываемый нами случай уникален по высокому уровню депонирования ^{239}Pu и отсутствию возможного влияния других генотоксических факторов, как это было установлено по данным анамнеза, анализа профессионального маршрута и результатам систематических комплексных медицинских обследований. Следует отметить также, что высокие дозы облучения костного мозга не привели к дисплазии кроветворения. В то же время характер сдвигов в миелограмме свидетельствует о напряжении в функционировании костного мозга и компенсаторной реакции на повреждение и дефект в восстановлении стволовых кроветворных клеток. Любой дополнительный генотоксический фактор или фактор, способный предъявить повышенные требования к функционированию системы кроветворения, могут привести к срыву компенсаторных реакций и формированию патологии. Цитогенетические исследования позволяют устанавливать степень структурного повреждения генома соматических клеток и дают осно-

вание предполагать возможность постепенной убыли тяжело поврежденных клеток стволового пула, формирования патологических клеточных клонов при пролонгированном радиационном воздействии, каковым является внутреннее облучение от инкорпорированного плутония. При аутопсии и гистологическом исследовании препаратов разных органов не выявлено новой, недиагностированной клинически патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раневое поступление ^{239}Pu (растворимое соединение) привело к преимущественному депонированию его в скелете с формированием высоких доз внутреннего облучения красного костного мозга. Накопление поглощенной дозы на красный костный мозг сопровождалось нарастанием нестабильности генома соматических клеток, выявленной с помощью теста ХА в лимфоцитах периферической крови. При поглощенной дозе на красный костный мозг 2.69 Гр частота ХА, как стабильных, так и нестабильных, многократно превышала спонтанный уровень (47–65 aberrаций на 100 анализируемых метафаз). Частота МА клеток была на два порядка выше значений, указываемых в литературе для групп населения разных географических зон.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин Л.А., Иванников А.Т. Радиоактивные вещества и раны. М.: Медицина, 1970. 255 с.
2. Johnson L.J. Plutonium contaminated wound experience and assay techniques of the Los Alamos scientific laboratory // Health Physics. 1974. V. 27. № 1. P. 55–93.
3. Hammond S.E., Putaier E.A. Observed effects of plutonium in wounds over a long period of time // Health Physics. 1964. V. 1. № 6. P. 399–406.
4. Хохряков В.Ф., Кудрявцева Т.И., Шевкунов В.А. Риск поступления плутония-239 и америция-241 в организм работников радиохимического предприятия через травмированную кожу // Атом. энергия. 1999. Т. 77. № 6. С. 445–448.
5. Schofield G.B. Comparisons in medical management of three cases of plutonium contaminated wounds // Sympos. on the Handling of radiation accidents, May 19–23, 1969, Vienna. Vienna, 1969. P. 00–00.
6. Khokhryakov V.F., Suslova K.G., Filipy R.E. et al. Metabolism and dosimetry of actinide elements in occupationally-exposed personnel of Russia and the United State: a summary progress report // Health Physics. 2000. V. 79. № 1. P. 63–71.
7. Awa A.A., Neel J.V. Cytogenetic "rogue" cells: What is their frequency, original and evolutionary significance? // Proc. Natl. Acad. USA. 1986. V. 83. P. 1021–1025.
8. Bochkov N.P., Katosova L.D. Analysis of multiaberrant cells in lymphocytes of persons living in different ecological regions // Mutat. Res. 1994. № 323. P. 7–10.

9. Griffin C., Mardsen S.J., Stevens D.L. et al. Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by ^{239}Pu α -particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome – specific probes // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. V. 67. № 4. P. 431–439.
10. Brandom W.F., Archer P.G., Bloom A.D. et al. Chronic irradiation effects in blood lymphocyte chromosomes in plutonium workers // *Mutat. Res.* 1978. V. 53. № 2. P. 153.
11. Tawn E.J., Hall J.W., Schofield G.B. Chromosome studies in plutonium workers. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1985. V. 47. № 5. P. 599–610.
12. Окладникова Н.Д., Токарская З.Б., Мусаткова О.Б. Цитогенетический эффект длительного воздействия инкорпорированного плутония-239 и внешнего гамма-облучения у профессионалов (клиническое исследование) // *Мед. радиология.* 1994. Т. 39. № 5. С. 48–52.
13. Николаевская Н.Г., Сохранич А.Л., Урядницкая Т.И., Муксинова К.Н. Структурные повреждения хромосом при действии двуокиси плутония-239 // *Радиобиология.* 1988. Т. 28. Вып. 4. С. 509–512.
14. Deng W., Morrison D.P., Gale K.L., Lucas J.N. Comparative study on potential Cytogenetic Fingerprints for Radiation LET in Human Lymphocytes // *Int. J. Radiat. Biol.* 2000. № 76. P. 1589–1598.

Поступила в редакцию
11.07.2003

^{239}Pu : Clinical-Cytogenetic Description of a Case with High Radionuclide Incorporation (24-Years of Follow-up)

**N. D. Okladnikova, V. V. Khokhryakov, V. A. Shevkunov*,
V. S. Pesternikova, A. E. Schadilov**

**Southern Ural Biophysics Institute, Ozyorsk, 456780 Russia;
e-mail: pesternikova@fiblko.chel-65.chel.su*

Occupational Radiation Pathology Center, Ozyorsk, Russia 456780

This paper describes a case, when large amounts of ^{239}Pu soluble compounds penetrated via injured skin and deposited in the skeleton, which resulted in high doses from chronic α -rays to the red bone marrow. The paper presents a pattern of absorbed dose formation over time, status of various organs and systems during 24 years of the followup, especially damages in the genome of somatic cells using the chromosomal aberration (CA) test in lymphocytes from peripheral blood. A high frequency of CA was revealed in the late times of clinical follow-up. It was demonstrated that densely-ionizing α -radiation is characterized by complex symmetrical and asymmetrical chromosomal exchanges and multia aberrant cells (MA).