

А. Б. Маргулис, С. А. Рыжкин, А. Н. Слесарева,
Н. В. Белоногова, В. Я. Пономарев, О. Н. Ильинская

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ НА РЕНТГЕНО-КОМПЬЮТЕРНЫХ ТОМОГРАФАХ

Ключевые слова: токсичность, мутагенность, генотоксичность, ферменты, рентгено-компьютерные томографы.

*Исследованы биологические эффекты облучения на рентгено-компьютерных томографах. Показано снижение количества колониеобразующих единиц для штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 в облученных вариантах по сравнению с контрольным. Мутагенные эффекты для исследуемых режимов облучения не выявлены.*

Keywords: toxicity, mutagenicity, genotoxicity, enzymes, X-ray computer tomographs.

*Investigated the biological effects of radiation on X-ray computed tomography. Shown to reduce the number of colony-forming units for *Salmonella typhimurium* strain TA 100 in the irradiated variants compared to the control. Mutagenic effects of exposure to the test modes haven't been identified.*

Введение

Среди вопросов, представляющих научный интерес, не многие приковывают к себе столь постоянное внимание общественности и вызывают так много споров, как вопрос о действии радиации на человека. К сожалению, достоверная научная информация по этому вопросу очень часто не доходит до пациентов, поэтому им приходится пользоваться всевозможными слухами. Радиация действительно смертельно опасна. При больших дозах она вызывает серьезные поражения тканей, а при малых – может вызывать рак и индуцировать генетические дефекты, которые, возможно, проявятся у детей и внуков человека, подвергшегося облучению, или у его более отдаленных потомков [1].

Для основной массы населения самые опасные источники радиации – вовсе не те, о которых больше всего говорят. Наибольшую дозу человек получает от естественных источников радиации. Радиация, связанная с развитием атомной энергетики, составляет лишь малую долю радиации, порождаемой деятельностью человека; значительно большие дозы мы получаем от других, вызывающих гораздо меньше нареканий форм этой деятельности, например – от применения рентгеновских лучей в медицине [1].

В настоящее время в клинической практике используются различные типы томографов, разные направления, углы размазывания и проекции томографии. Созданные для компьютерной томографии аппараты, от достаточно простого и дешевого до весьма дорогих и работающих в реальном масштабе времени, позволяют применить метод как в поликлинических условиях при проведении диспансеризации, так и в специализированных стационарах. Вместе с тем, возможности продольной томографии в практическом здравоохранении реализуются недостаточно.

Целью настоящей работы было выяснение оценки генотоксических эффектов облучения на рентгено-компьютерных томографах.

Материалы и методы исследования

Протокол облучения биологического материала представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Исследуемые дозы облучения

Номер образца	Название исследования	Установленные значения								Показатель дозы KT, мГр	DLP, мГр·см
		Фокус	U, кВ	I, мА	t, с	h, с	режим	d, мм	h, мм		
1	Brain native standard	БФ	120	300	0,7	-	helix	0,5	64	55,7	824,3
2	Abdomen native	БФ	120	300	0,5	-	helix	0,5	64	4,4	62,6
3	Lumbar spine	БФ	135	300	1,0	-	helix	0,5	64	74,5	1580

Оценка токсичности биологических, химических соединений и различных физических воздействий по отношению к тестерным микроорганизмам – обязательный этап, необходимый для подбора диапазона оптимальных концентраций и доз, при тестировании их на генотоксичность и мутагенность.

Экспериментальная часть

1. За 12-15 ч. до проведения эксперимента делают пересев культуры тестерного штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 с косяка в 5 мл LB-бульона для получения "ночной" культуры.
2. 2% LB-агар разливают в чашки Петри.
3. Делают разведения "ночной" культуры в водопроводной воде.
4. Растопленный 0.6% LB-агар разливают стерильно по 3 мл в пробирки и ставят в водяную баню при 45°C.
5. В пробирки с 3 мл полужидкого 0.6% LB-агара вносят 0.1 мл бактериальной суспензии нужного разведения и 0.1 мл раствора вещества в исследуемой концентрации (в нашем случае опытным вариантом служили облученные образцы). Раствор перемешивают и настилают на нижний 2% LB-агар в чашки Петри. В контроле вместо раствора вещества добавляют 0.1 мл растворителя (в случае облучения опытных образцов добавления растворителя в контроль не требовалось). После 24ч. инкубации при 37°C подсчитывают число колоний, выросших на чашках Петри в опытном и контрольном вариантах. Для оценки степени токсичности исследуемого вещества (в нашем случае - доз облучения) используют критерий "выживаемость" тестерного штамма при действии определенной дозы вещества.

число колоний в опыте

Выживаемость = $\frac{\text{число колоний в опыте}}{\text{число колоний в контроле}} \times 100\%$

Среды

LB-бульон: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, дистиллированная вода – 1000 мл. 2% LB-агар: LB-бульон – 1000 мл, агар – 20 г. 0,6% LB-агар: LB-бульон – 1000 мл, агар – 6 г.

В нашем случае разведение культуры делали до 10^{-5} . Полученные результаты представлены на рисунке (число КОЕ/ч.Петри).

Все сконструированные Эймсом с соавторами [2] тестерные штаммы исходно получены из штамма *Salmonella typhimurium* дикого типа LT2. Для повышения чувствительности этих штаммов к химическим мутагенам и канцерогенам в геном бактерий введены некоторые добавочные маркеры.

Оценку мутагенности проводили в тесте Эймса на мутантном штамме *S. typhimurium* TA 100 – *his* G46, *rfa*, *uvr*-, *pkm* 101, *bio*-. Мутация в гистидиновом опероне (*his*-) вызывает ауксотрофность по этой аминокислоте у мутантов. Штамм TA 100 регистрирует мутации типа замены пар оснований (*his* G46). Мутация в гене *uvr* В приводит к нарушению процесса эксцизионной репарации, благодаря чему возникшее повреждение ДНК остается неисправленным и, таким образом, увеличивается чувствительность тестерного штамма к некоторым мутагенам. Делеция в гене *uvr* В проходит также и через ген *bio*. При *rfa*-мутации (“шероховатые колонии”) нарушается синтез липополисахаридов, в результате чего клетка теряет патогенность, а также возрастает проницаемость ее клеточной стенки и облегчается проникновение мутагенов в клетку. Штамм TA 100 несет также плазмиду устойчивости к ампициллину *pKm* 101 и ген *umu* C, что увеличивает вклад ошибочной репарации в процесс мутагенеза, и, следовательно, чувствительность штамма [2,3]. В тесте на токсичность также использовали мутантный штамм *S. typhimurium* TA 100.

Сущность теста заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой. Если в среду культивирования ввести химический мутаген, или воздействовать физическим мутагеном (например, радиационное облучение), то частота мутаций значительно увеличивается, что регистрируется по числу колоний.

Если число колоний-ревертантов в опыте и контроле достоверно различается менее, чем в 2,5 раза, то делается заключение об отсутствии мутагенной активности. Если фиксируют превышение от 2,5 до 10 раз, то делается заключение о наличии слабой мутагенной активности. Превышение от 10 до 100 раз говорит о средней мутагенной активности исследуемого соединения. Если фиксируют превышение более, чем в 100 раз, - вещество обладает сильной мутагенной активностью [4,5].

Проверке на мутагенность всегда предшествовала проверка токсичности облучения по отношению к тестерным штаммам для исключения воз-

можности получения ложноотрицательных результатов в испытаниях на мутагенность.

Условия культивирования *Staphylococcus aureus*: выращивание суточной культуры (24 часа) проводили на L-бульоне при 37°C.

Для определения гемолитической активности использовали кровяной агар с добавлением 5% суспензии эритроцитов барана. О величине общей гемолитической активности судили по размеру зон лизиса вокруг колоний *S. aureus* на кровяном агаре.

Для определения протеолитической активности использовали молочный агар: мясопептонный агар с добавлением 10 % пастеризованного молока. О величине протеолитической активности судили по размеру зон лизиса вокруг колоний *S. aureus* на молочном агаре.

Для определения лецитиназной активности использовали желточно-солевой агар (ЖСА): мясопептонный агар с добавлением 10% NaCl и 10% суспендированного желтка (желток одного яйца суспендируют в 200 мл 0,8% NaCl). О величине лецитиназной активности судили по зонам помутнения среды вокруг колоний *S. aureus* на ЖСА.

Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в компьютерной программе “Microsoft-Excel”.

Оценка токсических и генотоксических эффектов исследуемых доз облучения

Токсический эффект определяли по выживанию тестерного штамма в опытных вариантах по сравнению с контрольным [4,5]. Ранее аналогичные исследования нами были проведены в отношении химических соединений фуранонового ряда [6]. Тестерным штаммом в опыте служила *Salmonella typhimurium* TA 100.

В ходе работы было зарегистрировано снижение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) приблизительно в 5 раз для облученных вариантов (рис. 1).

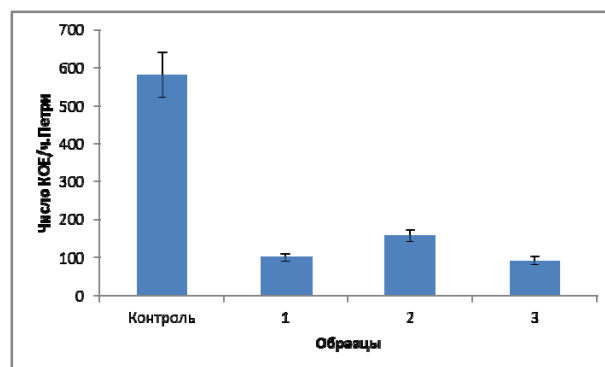


Рис. 1 – Число КОЕ *S. typhimurium* на ч.Петри в облученных вариантах по сравнению с контролем

Далее мы определяли мутагенные эффекты исследуемых доз облучения. Результаты представлены на рисунке 2.

Мутагенных эффектов не наблюдали, однако это может быть связано с высокими токсическими эффектами выбранных режимов облучения. Воз-

можно, при работе с меньшими дозами мутагенные эффекты могли быть зарегистрированы.

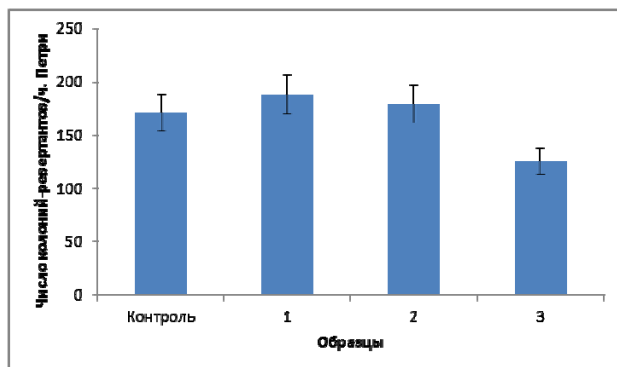


Рис. 2 – Число колоний-ревертантов в тесте Эймса в облученных вариантах по сравнению с контролем

Оценка выживаемости и физиолого-биохимических параметров золотистого стафилококка при действии облучения

Для определения ферментативной активности провели высеивание на кровяной агар для определения гемолитической активности, на молочный агар для определения протеолитической активности, на желточно-солевой агар (ЖСА) для определения лецитиназной активности. Ни в одном из вариантов изменения ферментативных активностей по сравнению с контролем не наблюдали.

В то же время наблюдали снижение числа КОЕ в образцах, подвергшихся обработке, в 1.5-2.5 раз по сравнению с контролем (рис. 3).

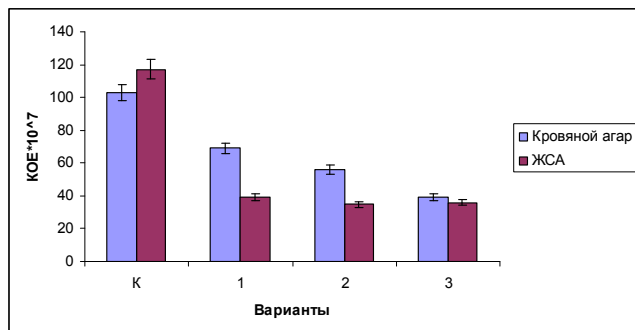


Рис. 3 – Изменение количества КОЕ *S.aureus* на ч. Петри после облучения по сравнению с контролем

Таким образом, нами показано, что микроорганизмы реагируют на облучение рентгено-компьютерных томографов в режимах, применяемых для работы в медицинских учреждениях, в связи с чем необходимы исследования подобных воздействий на собственную микрофлору человека.

Публикация подготовлена в рамках поддержанного РГНФ и Правительством Республики Татарстан научного проекта №14-16-16002.

Литература

1. Маньковская, О.Л. Компьютерная томография - больше пользы или вреда? [Текст] / О. Л. Маньковская // АВС-ДИАГНОСТИКИ, – 2010. – Т. 69. – С.74.
2. Ames, B. N. An improved bacterial test system for defecation and classification of mutagens and carcinogens [Text] / B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston // Procl. Nac. Akad. Sci.- USA.- 1973.- V.70, N3.- P. 782.
3. Maron, D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test [Text] / D.M. Maron, B.N. Ames // Mutat. Res.- N113.- 1983.- P.174-210.
4. Фонштейн, Л. М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем [Текст] / Л. М. Фонштейн, С. К. Абилов, Е. В. Бобринев; Методические указания.- Москва, 1985.- 34с.
5. Маргулис, А.Б. Методы генетической токсикологии / А.Б. Маргулис, Н.С. Карамова, О.Н. Ильинская // Учебно-методическое пособие.- Казань: КФУ, 2012.- 36 с.
6. Митько, В.Е. Токсические и генотоксические эффекты новых синтезированных фуранонов и их галогенированных производных [Текст] / В.Е. Митько, А.Б. Маргулис, В.Я. Пономарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Вестник Казанского технологического университета.- 2013.- Т.16, №11.- С.211-213.

© А. Б. Маргулис - к.б.н., доцент каф. микробиологии К(П)ФУ, anna.margulis@kpfu.ru; С. А. Рыжкин - к.м.н., доц. каф. общей гигиены с курсом радиационной гигиены Казанский ГМУ Минздрава России, rsa777@inbox.ru; А. Н. Слесарева - вед. специалист лаб. радиационного контроля ООО "РЕНИР", anngls.mt@gmail.com; Н. В. Белоногова - асп. каф. микробиологии К(П)ФУ; В. Я. Пономарев - к.т.н., доцент каф. технологии мясных и молочных продуктов КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com; О. Н. Ильинская - д.б.н., проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@kpfu.ru;

© A. B. Margulis - PhD, assistant professor. Department of Microbiology, Kazan Federal University, anna.margulis@kpfu.ru; S. A. Ryzhkin - assistant professor of general hygiene with a course of radiation hygiene, Kazan State Medical University Russian Ministry of Health, rsa777@inbox.ru; A. N. Slesareva - a leading specialist, Laboratory of Radiation Control LLC "RENIR", anngls.mt@gmail.com; N. V. Belonogova - Post-graduate student Department of Microbiology, Kazan Federal University; V. Ya. Ponomarev - Ph.D., assistant professor. Department of meat and dairy products technology of KNRTU, v.y.ponomarev@gmail.com; O. N. Ilinskaya - Ph.D., Professor, Head of Department of Microbiology, Kazan Federal University, olga.ilinskaya@kpfu.ru.