ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
ORIGINAL ARTICLES

ЕФЕКТ НА НИСКИ ДОЗИ ЙОНИЗИРАЩО ЛЪЧЕНИЕ ВЪРХУ ГЕНОМНА НЕСТАБИЛНОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТЕОПОРОЗА СЛЕД ВЕРТЕБРОПЛАСТИКА

И. Иванова[1], А. Стайнова[1], Хр. Христов[2], Кр. Нинов[2], Л. Хаджийска[1], Н. Костова[1], Е. Захариева[1], Д. Георгиева[1], М. Атанасова[1], Р. Христова[1]

[1]Отдел по радиобиология, Национален център по радиобиология и радиационна защита – София
[2]Клиника по неврохирургия, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София

Резюме. *Остеопорозните вертебрални фрактури засягат 1,4 милиона пациенти в света годишно. Симптоматичните фрактури се лекуват с минимално инвазивни операции под флуороскопски контрол, в резултат на което пациенти и персонал получават ниски дози облъчване. Съгласно линейния безпрагов модел (LNT), използван за оценка на радиационен риск от рак, не съществува количество радиация, което да се счита за напълно безопасно.* ***Целта*** *на изследването е да се направи оценка на генотоксичното влияние на ниските дози йониращa радиация при пациенти с остеопороза след проведена вертебропластика.* ***Методи:*** *За да постигнем поставената цел, използвахме метод за количествено определяне на двойноверижни разкъсвания в молеклулите на ДНК чрез флуоресцентна микроскопска визуализация на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ (ДРФ) в лимфоцити от периферна кръв. Анализът включи 42 пациенти във възрастов диапазон от 60 до 91 години, получили средна кумулативна въздушна керма доза по време на флуороскопия 22,07 mGy в диапазон от 5 до 86,1 mGy. Количеството йонизиращо лъчение, получено от всеки пациент, е в категория ниски дози радиация (≤ 100 mGy).* ***Резултати:*** *След анализ на общо 8200 клетки на пациенти установихме статистически значимо увеличение в честотата на γ-H2AX/53BP1 ДРФ при пациенти след вертебропластика 1,28 ± 0,06 в сравнение с първоначалната им честота преди операцията 0,70 ± 0,04 (p < 0,0001). Това увеличение не е статистически обвързано с количеството получена кумулативна въздушна керма доза, нито с възрастта на пациентите.* ***Заключение:*** *Нашето предварително проучване показва значително увеличение на увреждането на генома след минимално инвазивна оперативна интервенция – вертебропластика, въпреки ниските и много ниските дози, получени по време на флуороскопия. Неправилно поправените двойноверижни разкъсвания в молекулите на ДНК имат потенциал да се проявят в стабилни хромозомни аберации.*

Ключови думи: *вертебропластика, флуороскопия, остеопороза, йонизиращо лъчение, ниски дози, много ниски дози, геномна нестабилност, двойноверижни разкъсвания в ДНК, γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“*

Въведение

Вертебрални фрактури засягат приблизително 1,4 милиона пациенти с остеопороза в света годишно [1], като само в Европа броят им е 400 000 и според демографската прогноза може да се удвои до 2050 г. [2-4]. Остеопорозата е причината за 80% от всички гръбначни фрактури. Световната здравна организация (СЗО) разпознава това заболяване като основен здравен проблем на застаряващите нации [5]. Въпреки че повечето пациенти имат леки симптоми, част от тях изпитват значителна болка и някои се нуждаят от хоспитализация. Стандартната терапия, състояща се от почивка, обезболяване и обездвижване, често е неподходяща за възрастни хора [6, 7].

Използването на минимално инвазивни хирургични решения за лечение на тези фрактури се увеличава прогресивно, с тенденция това увеличение да се запази и в бъдеще. Минимално инвазивните хирургични техники, извършвани под флуороскопски контрол, имат предимствата

на по-малки следоперативни рани, незначителна кръвозагуба, по-кратко време за хоспитализация и по-нисък риск от последващи усложнения. Въпреки това рискът от ниски дози йонизиращо лъчение за пациенти и медицински персонал остава основният им недостатък [8]. Вертебропластиката, която е имплантиране на полиметилметакрилат (PMMA) в прешлен с фрактура, често се използва за стабилизиране на фрактурата и облекчаване на болката. Тази процедура се извършва под флуороскопски контрол, за получаване на рентгенографски изображения в реално време [7, 9].

Ефектите от ниски дози облъчване върху човешкото здраве не са окончателно изяснени и усилията на професионалистите и обществеността по отношение на безопасното и ефективно използване на радиацията в медицината са насочени към радиационната защита на пациента. В тази връзка Международната агенция за атомна енергия (МААЕ) разработва образователни и информационни системи в областта на радиационната защита при интервенционални процедури под флуороскопски контрол (SAFRAD) [10]. Дозите, получени в интервенционалната радиология, предизвикват значително увреждане на ДНК в кръвните клетки на пациенти [11, 12] и медицински персонал [13].

Йонизиращото лъчение е универсален мутаген, инициращ широк спектър от двойноверижни разкъсвания в ДНК (ДВР). Ако не настъпи клетъчна смърт, рискът от развитие на неоплазми може да се увеличи поради натрупването на неправилни поправки в ДНК и произтичащата от това геномна нестабилност [14, 15]. Установено е, че образуването на двойноверижни разкъсвания в ДНК съответства на дозата на облъчване [16]. Радиационно-индуцираните ДВР в ДНК водят до фосфорилиране на серин-139 в хистоновия вариант H2AX до 3 минути след облъчване [17]. За количествена оценка на радиационното увреждане на генома в лимфоцити от периферна кръв широко се използва имунохимичната колокализация на γ-H2AX и 53BP1 ядрени протеини, участващи в репаративните пътища за поправка на ДНК. В резултат в анализираните клетки чрез флуоресцентен микроскопски анализ се наблюдават т.нар. ДНК репаративни „фокуси“ (ДРФ). ДРФ са ценен биомаркер в изследването на ниски дози йонизиращи лъчения и броят им съответства на броя двойноверижни разкъсвания в ДНК, като чувствителността на метода достига 0.003Gy [18-20].

Целта на това проучване беше да се определи количественото увреждане в генома на пациенти след интервенционална радиология, чрез използване на визуализация на γ-H2AX ДНК репаративни „фокуси“ за определяне на двойноверижни разкъсвания в молекулите на ДНК при вертебропластика. Няма литературни данни за анализ на ефекта на ниски дози йонизиращо лъчение върху пациенти с остеопороза след вертебропластика. Натрупването на данни за възникващи генетични промени след ниски дози медицинско облъчване ще допринесе за по-точна оценка на риска за пациенти и персонал при минимално инвазивни медицински интервенции, извършвани под флуороскопски контрол.

Материал и методи

Кръвни проби

В това проучване бяха включени 42-ма пациенти с остеопороза, подложени на вертебропластика. На всеки пациент бяха взети две проби от периферна кръв непосредствено преди и след медицинската процедура. За всеки пациент бяха записани данни за възраст, пол, тегло, ръст, продължителност на флуороскопия, брой оперирани гръбначни нива и получена кумулативна въздушна керма доза, регистрирана от използвания Philips BV Pulsera рентгенов апарат. За контролна група е използвана група от здрави индивиди от населението.

γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ и микроскопски анализ

Кръвните проби бяха взети чрез венепункция и събрани в епруветки с хепарин (Greiner-Bio-One). От тях с помощта на Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), съгласно протокола на производителя, бяха изолирани клетки лимфоцити. Клетките бяха промити трикратно във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), ресуспендирани и преброени автоматично (Countess™, Invitrogen). Тяхната жизнеспособност беше > 85%. Изолираните клетки бяха нанесени върху микроскопски предметни стъкла (Thermo science) с концентрация ~1x106 клетки/ml. След това бяха фиксирани в 2% формалдехид (Polysciences Incorporated), пермеабилизирани в 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) и блокирани в 1% BSA/PBS (Sigma-Aldrich). Клетките бяха инкубирани за 40 минути с две първични антитела: Mouse anti-phospho-H2AX Ser139 (Millipore, Cat # 05-636-I) и Rabbit polyclonal to 53BP1 (Abcam, Cat # ab36823), разредени съответно до 1:500 и 1:400 в 1% BSA/PBS и промити. След това бяха

инкубирани за 20 минути на тъмно със съответни вторични флуоресцентни антитела: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen, Cat # A11029) и Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Invitrogen, Cat # A21429), и двете разредени до 1:500 в 1% BSA/PBS. След финално трикратно промиване с 1% BSA/PBS микроскопските стъкла бяха изсушени, оцветени с разтвор на DAPI Vectashield (Vector Laboratories) и съхранени при температура -20°C за допълнителен анализ. Анализът беше извършен с флуоресцентен микроскоп Olimpus BX41 (оборудван с филтърни блокове за възбуждане на червена, зелена и синя флуоресценция) под имерсионен обектив с увеличение 100x. Анализирани бяха 100 клетки за всеки пациент и за всяка експериментална точка (преди и след вертебропластика).

Статистически анализ

Честотата на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ (ДРФ) в клетка беше изчислена с формулата: *Σ ДРФ/n* клетки, където *Σ ДРФ* е общ брой ДНК ДРФ в анализираните клетки, а *n* е броят анализирани клетки. Статистическата обработка на получените данни беше извършена с MS Excel, SigmaPlot 14.5 и IBM SPSS Statistics 23. Бяха използвани t-тест, сдвоен t-тест, корелационен тест на Пиърсън и множествен линеен регресионен анализ за данни с нормално разпределение. Непрекъснатите променливи бяха изразени като *средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (SEM)*.

Резултати

Основни характеристики на групата пациенти

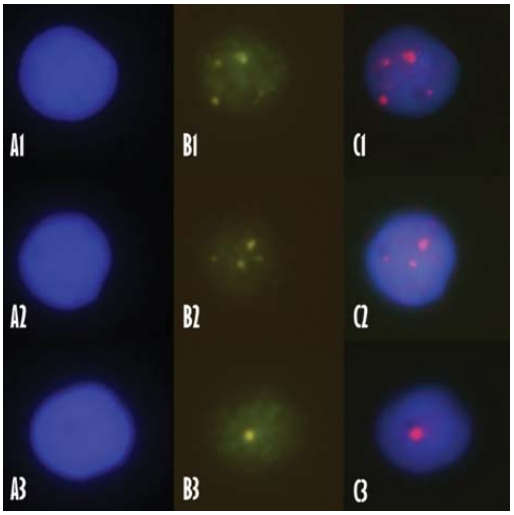
В настоящото изследване са включени 42-ма пациенти с остеопороза и компресионна фрактура на прешлените. Подложени на вертебропластика са 74% жени и 26% мъже – във възрастов диапазон от 60 до 91 години (71 г. средно). 52% от травмите са на лумбални и 48% – на торакални прешлени. При трима пациенти се наблюдава комбинирана лумбална и торакална травма. 26-ма пациенти са третирани на едно гръбначно ниво, тринадесет – на две нива, двама – на три нива и един пациент получи оперативно лечение на четири лумбални прешлена. Средното време на флуороскопия е 1:15 минути в диапазон от 0:12 до 2:53 минути и средната кумулативна въздушна керма доза е 22,07 mGy в диапазон от 5 до 86,1 mGy. Основните характеристики на изследваните пациенти са представени в таблица 1.

Таблица 1. Основни характеристики на изследваните пациенти

Пациенти, брой	42
женски пол/мъжки пол, %	26/74
Средна възраст (диапазон), години	71(60÷91)
ИТМ (интекс на телесна маса)	26.0(20.2÷35.5)
Етиология, %	
Остеопороза	100
Травма	100
Анатомична локация, %	
лумбални	52
торакални	48
Оперирани прешленни нива, брой пациенти	
1	26
2	13
3+	3
Средно флуороскопско време (диапазон), минути	1:15(0:12÷2:53)
Средна доза на облъчване (диапазон), mGy	22.07(5÷86.1)

Анализ и честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“

Общо 8200 клетки са анализирани под флуоресцентен микроскоп за възникнали γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ при пациенти преди и след вертебропластика. Примерни микроскопски изображения от микроскопския анализ са представени на фиг. 1.



Фиг. 1. Микроскопски изображения на колокализирани γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ при пациент. Визуализация на ядрено оцветяване с DAPI в синьо (A), 53BP1 протеин в зелено (B) и γ -H2AX протеин в червено оцветяване

Спонтанната честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ в клетка в лимфоцити от периферна кръв за българското население е 0,29 ± 0,08. Честотата на ДРФ при пациенти, подло-

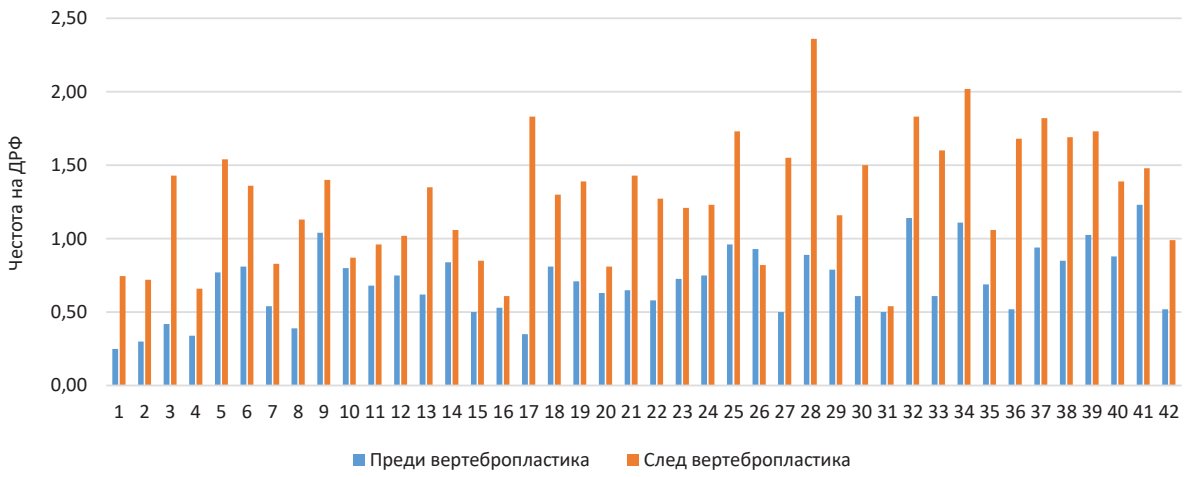
жени на вертебропластика, е съответно 0,70 ± 0,04 преди и 1,28 ± 0,06 след медицинската процедура. *Установено е статистически значимо увеличение на честотата на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ в клетките на пациенти след вертебропластика (p < 0,001).* Също така се наблюдава статистически значима разлика в честотата на ДРФ при пациенти преди вертебропластика в сравнение с контролната група от населението (p < 0,001). Средното увеличение на честотата на ДРФ при пациенти след вертебропластика е 205,51% ± 12,40 – минималното увеличение е 8%, а максималното 422,86% след медицинската интервенция. Само за един пациент е регистрирано намаление в честотата на ДРФ с 11,83% (фиг. 2 и 3).

За допълнителен анализ изследваните пациенти бяха разделени в четири дозови групи. Първа група – пациенти, които са получили кумулативна въздушна керма доза до 10 mGy; втора група – от 11 до 20 mGy; трета група – от 21 до 30 mGy и четвърта група – получили повече от 31 mGy по време флуороскопия. За всяка дозова група е установено статистически значимо увеличение в честотата на ДРФ след вертебропластика в сравнение с честотата преди медицинската процедура. Не е установена статистически значима разлика в честотата на ДРФ след вертебропластика между четирите дозови групи (таблица 2).

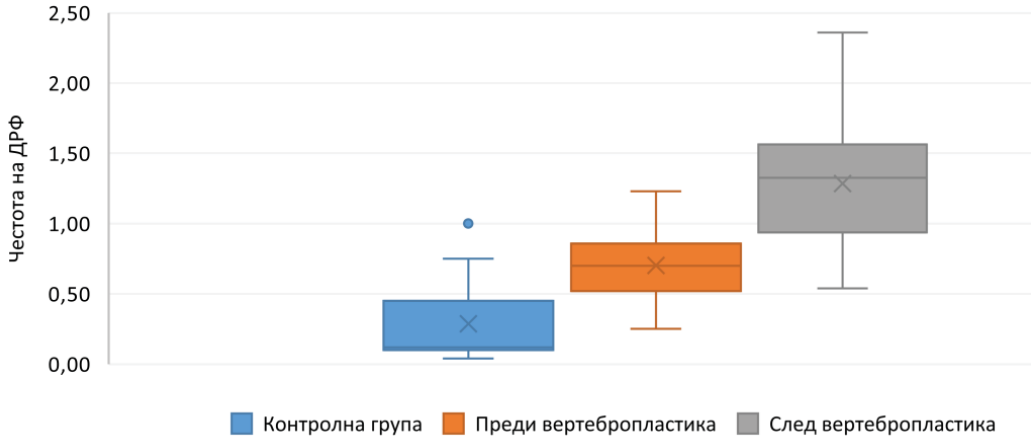
Не е намерена статистически достоверна корелация между честотата на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ при пациенти след вертебропластика и тяхната възраст (p > 0,05).

Тенденция за корелация между кумулативна въздушна керма доза и BMI

Чрез множествен линеен регресионен анализ е намерена тенденция за положителна корелация между получена кумулативна въздушна керма доза след вертебропластика и индекс



Фиг. 2. Честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ в лимфоцити на 42-ма пациенти преди и след вертебропластика



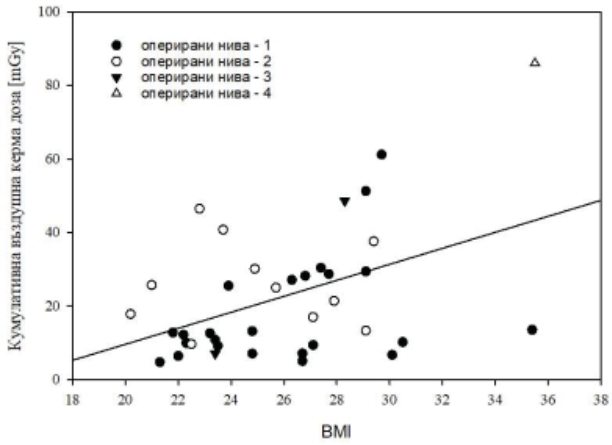
Фиг. 3. Честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ за контролна група от населението и за 42-ма пациенти преди и след вертебропластика

Таблица 2. Данни за експозиция на изследваните пациенти в четири дозови групи

Кумулативна въздушна керма доза [mGy]	Брой пациенти [N]	Честота на ДРФ преди вертебропластика (±SEM)	Честота на ДРФ след вертебропластика (±SEM)
0,1 - 10	14	0.80 (±0.07)	1.37 (±0.10)*
11-20	9	0.62 (±0.06)	1.3 (±0.16)*
21-30	12	0.68 (±0.05)	1.21 (±0.14)**
31+	7	0.65 (±0.10)	1.22 (±0.15)***

**p<0.001; **p=0.002; ***p=0.009*

на телесна маса (BMI) на пациентите, при отчитане броя на оперираните прешлени ($p < 0.05$) (фиг. 4).



Фиг. 4. Тенденция за увеличаване на получената кумулативна въздушна керма доза при пациенти след вертебропластика с увеличаване на BMI на пациентите при отчитане броя на оперираните прешлени

Обсъждане

В настоящото проучване използвахме честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ (ДРФ) в клетка като биомаркер за радиационно-индуцирани двойноверижни разкъсвания (ДВР) в молекулите на ДНК и за оценка на потенциалната генотоксичност на ниски дози йонизиращо лъчение в лимфоцити от периферна кръв при 42-ма пациенти с остеопороза, подложени на вертебропластика. При всички пациенти се наблюдава тенденция за увеличаване на честотата на ДРФ след вертебропластика в сравнение с честотата им преди медицинската процедура.

Изводите от настоящото проучване са в съответствие с други изследвания върху ниски дози йонизиращи лъчения. По литературни данни е установено увеличаване на честотата на ДНК репаративни „фокуси“ и повишена честота на увреждане на ДНК в лимфоцити на пациенти след действието на ниски дози йонизиращо лъчение, получени по време на медицински радиологични процедури [21, 22]. Jin et al. съобщават за статистически значимо увеличение на честотата на γ-H2AX ДРФ в мононуклеарни клетки при пациенти, подложени на сърдечна катетеризация [23]. Повишени нива на γ-H2AX ДНК репаративни „фокуси“ са открити също така и след педиатрични сърдечни катетеризации, след CT изследвания и след перкутанна транслуминална ангиопластика [24, 25].

Нашето проучване показа наличие на индивидуална реакция по отношение на индукцията на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ в клетките на пациенти след облъчване с ниски и много ниски дози. За един от изследваните пациенти е наблюдавано 8% увеличение в честотата на ДРФ след вертебропластика, докато при друг пациент е наблюдавано 422,86% увеличение, като в същото време двамата пациенти са получили близка по стойност кумулативна въздушна керма доза – съответно 21,40 mGy, и 27,10 mGy – по време на флуороскопия. Статистически значимо повишаване в честотата на ДРФ се наблюдава дори при първата група пациенти, получили много ниски дози радиация. Липсата на линейна зависимост между получената въздушна керма доза за четири дозови групи и честотата на ДРФ също е индикация за индивидуални различия по отношение радио-

чувствителност на изследваните пациенти към ниски дози йонизиращи радиация.

Увеличеното увреждане на ДНК в кръвни клетки след облъчване с ниски дози йонизиращи лъчения при пациенти след вертебропластика, което беше демонстрирано в настоящото проучване, е в съгласие с линейния безпрагов модел (ЛБМ) за оценка на риска. Консенсусът на регулаторните организации за радиационна защита за изчисляване на риска от рак, предизвикан от йонизиращи лъчения, понастоящем се основава на ЛБМ, без прагова безопасна доза [26-28].

Установената в това проучване честота на γ-H2AX/53BP1 ДНК репаративни „фокуси“ е значително по-висока при всички пациенти в сравнение с честотата на ДРФ в контролната група от населението. Предпоставка за това биха могли да бъдат предхождащи медицински процедури, включващи въздействието на йонизиращо лъчение. Тези данни са в съответствие с резултатите на Colin et al., които установяват увеличен брой на γ-H2AX ДРФ и увеличен радиационно-индуциран брой на γ-H2AX ДРФ в клетъчни култури от първични епителни клетки на млечната жлеза на високорискови пациенти в сравнение с пациенти с нисък риск [29].

Липсата на корелация между честотата на ДРФ след вертебропластика, възрастта и получената кумулативна въздушна керма доза вероятно се дължи на ограничения възрастов диапазон на изследваната група и индивидуалната радиочувствителност към ниски дози йонизиращо лъчение. В същото време беше открита тенденция за положителна корелация на кумулативната въздушна керма доза, получена от пациенти при флуороскопия и техния индекс на телесна маса. За потвърждаване на тази зависимост е нужно изследване на по-голяма група пациенти, подложени на минимално инвазивни медицинки процедури, извършвани под рентгенов контрол.

Заключение

Нашето предварително проучване показа значително увеличаване на увреждането на ДНК при пациенти след минимално инвазивната медицинска процедура вертебропластика. Тези данни могат да допринесат за бъдещото развитие на стратегии за намаляване на радиационната доза за пациента, когато това е възможно. Съществува необходимост от количествена оценка на неправилно поправените двойноверижни разкъсвания в молекулите на ДНК с цел оценка на риска при ниски дози и много ниски дози йонизираща радиация за пациенти и медицински персонал.

Етична декларация

Всички, участващи в това проучване, предоставиха своето писмено информирано съгласие.

Конфликт на интереси

Авторите на това проучване декларират, че не съществува конфликт на интереси.

Финансиране

Това научно изследване е извършено с финансовата подкрепа на Фонд "Научни изследвания" към Министерство на образованието и науката на Република България; грант № КП-06-Н63/6/13.12.2022 г.