

ISSN - 0250 - 5010

ANNALEN  
VAN  
DE BELGISCHE VERENIGING  
VOOR  
STRALINGSBESCHERMING

---

---

VOL. 28, N°2, 2003,

3e trim. 2003

**Dosimétrie biologique**  
**Biologische Dosimetrie**

Driemaandelijkse periodiek  
2400 MOL 1

Périodique trimestriel  
2400 MOL 1

---

---

ANNALES  
DE  
L'ASSOCIATION BELGE  
DE  
RADIOPROTECTION

Hoofdredacteur

Mr C. Steinkuhler  
Rue de la Station 15  
B- 1325 Longueville

Rédacteur en chef

Redactiesecretariaat

Mme Cl. Stiévenart  
Av. Armand Huysmans 206, bte 10  
B- 1050 Bruxelles - Brussel

Secrétaire de Rédaction

Publikatie van teksten in de Annales  
gebeurt onder volledige verantwoorde-  
lijkheid van de auteurs.

Nadruk, zelfs gedeeltelijk uit deze  
teksten, mag enkel met schriftelijke  
toestemming van de auteurs en van  
de Redactie.

Les textes publiés dans les Annales  
le sont sous l'entière responsabilité  
des auteurs.

Toute reproduction, même partielle,  
ne se fera qu'avec l'autorisation  
écrite des auteurs et de la  
Rédaction.

Ce numéro contient les textes d'exposés présentés lors de la réunion organisée par l'Association belge de Radioprotection à Bruxelles, le 21 février 2003.

Dit nummer bevat de teksten van de uiteenzettingen ter gelegenheid van de vergadering van de Belgische Vereniging voor Stralingsbescherming in Brussel, op 21 februari 2003.

**Dosimétrie biologique  
Biologische dosimetrie  
BVSABR, 21.02.2003**

**SOMMAIRE**

**INHOUD**

- A. LEONARD, G.B. GERBER, N. AKHMATULLINA, J. RUEFF, E. IMYANITOV**  
Application, à des populations du Kazakhstan, des méthodes de dosimétrie biologique basées sur les techniques cytogénétiques **77**
- N. AKHMATULLINA, E.G. GUBITSKAYA, G.B. GERBER**  
Chromosome Aberrations in People Living in Regions of Semipalatinsk (Kazakhstan) Polluted with Radioactivity **81**
- H. THIERENS, A. VRAL, A. BAEYENS, K. DE RUYCK, L. DE RIDDER, M. BARBE, M. MEIJLAERS, K. CLAES L. MESSIAEN**  
Application of Cytogenetic Radiosensitivity Assays in Breast Cancer Patients and Temporary Radiation Workers **93**
- P. VOISIN**  
Les travaux de normalisation en dosimétrie biologique **105**

## **APPLICATION, A DES POPULATIONS DU KAZAKHSTAN, DES METHODES DE DOSIMETRIE BIOLOGIQUE BASEES SUR LES TECHNIQUES CYTOGENETIQUES**

**A.Léonard<sup>(1)</sup>, G.B.Gerber<sup>(1)</sup>, N.Akhmatullina<sup>(2)</sup>, J.Rueff<sup>(3)</sup>, E.Imyanitov<sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup> U.C.L. 7237, Avenue E.Mounier 72, B-1200 Bruxelles

<sup>(2)</sup> Institute of General Genetics and Cytogenetics, Almaty, Kazakhstan

<sup>(3)</sup> New University of Lisbon, Lisbonne, Portugal

<sup>(4)</sup> Petrov Research Institute of Oncology, St.Petersbourg, Russie

### **Résumé**

Dans le cadre d'un contrat de recherches financé par la Commission Européenne et réunissant des laboratoires belge, portugais, kazakh et russe, des études sont actuellement effectuées au Kazakhstan au moyen de diverses méthodes de dosimétrie biologique basées sur les techniques cytogénétiques. Ces recherches sont notamment réalisées sur des populations vivant dans le Semipalatinsk où ont eu lieu plus de 450 essais nucléaires et aux environs d'une décharge voisine de la Mer Caspienne où sont stockés les déchets d'une centrale à neutrons rapides et ceux de mines d'uranium.

### **DOMAINES D'UTILISATION DE LA DOSIMETRIE BIOLOGIQUE**

La dosimétrie biologique basée sur l'observation, dans les lymphocytes du sang périphérique, d'anomalies instables (chromosomes polycentriques) ( Buckton et Evans, 1973), des microyaux (Prosser et al., 1988), ou, encore, des anomalies stables telles que les translocations (méthode FISH, pour Fluorescence In Situ Hybridisation) (Cremer et al., 1996) s'est révélée un complément intéressant de la dosimétrie physique dans les cas d'exposition accidentelle à une dose aiguë de rayonnements ionisants. Dans certains cas, ces méthodes ont permis, non seulement, de donner une estimation des doses reçues mais aussi de fournir des informations sur l'homogénéité de l'exposition et sur la fraction du corps qui a été exposée (Hilali et al., 1991).

Lors d'accidents, tels que celui de Tchernobyl, la dosimétrie biologique est apparue beaucoup moins intéressante (Lloyd et Sevankaev, 1996), d'une part parce que le taux attendu d'anomalies produit par une radiocontamination de type chronique par des radionucléides tels que l'I-131, le Cs-137, etc, était faible et que, d'autre part, les études réalisées sur des personnes ayant reçu des doses élevées ont montré que la survie des lymphocytes porteurs d'anomalies instables ( méthode la plus utilisée) est relativement courte, le taux de

dicentriques diminuant selon une courbe exponentielle pour se stabiliser, quelques mois après l'exposition, à des valeurs légèrement supérieures à celles des témoins (Léonard et al., 1988).

## **NATURE DES ETUDES EFFECTUEES AU KAZAKHSTAN**

Le Kazakhstan apparaissait comme un endroit idéal pour la confirmation des conclusions des études effectuées après Tchernobyl. De 1949 à 1989, en effet, les Russes y ont procédé à plus de 450 essais nucléaires, dont 116 à l'air libre, et ces explosions, équivalentes à plus de 17 millions de tonnes de TNT, ont affecté une population de plusieurs dizaines de milliers de personnes via les quantités énormes de radionucléides (I-131, Pu, Sr-90, Cs-137) qui ont été émises (Léonard et Gerber, 2002). A la contamination radioactive résultant de ces essais s'ajoute, dans d'autres régions, celle, non négligeable, due au stockage anarchique des déchets radioactifs. C'est notamment le cas pour le réacteur à neutrons rapides Gur'euskaia qui est en activité, depuis 1975, à Aktau sur la mer Caspienne : les déchets de ce réacteur, ainsi que ceux des mines d'uranium et des industries chimiques de la région, sont stockés dans le lac Kora autour duquel est installé un bidonville dont les habitants viennent récupérer ce qu'ils peuvent au moyen de radeaux de fortune.

Devant la gravité de la situation, la Commission Européenne nous a confié une recherche, comprenant à la fois des observations cytogénétiques et des études sur le polymorphisme de certains gènes capables d'influencer la sensibilité à l'induction de dommages au matériel génétique, et la mise en parallèle des résultats obtenus avec les données disponibles sur la morbidité et la mortalité, et leurs causes, dans ces régions.

Nous présentons dans l'exposé qui suit les résultats des études cytogénétiques effectuées sur les populations vivant dans la région du Semipalatinsk où ont eu lieu les essais nucléaires.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat ICA2-2000-10056 de la Commission Européenne auquel participent des laboratoires belge, portugais, kazakh et russe.

## **Références**

### **1. Buckton, K.E. et H.J. Evans (1973)**

Methods for the analysis of human chromosome aberrations  
WHO, Geneve, 66p.

### **2. Cremer, C., Ch. Münkler, M. Granzov, A. Jauch, S. Dietzel, E. Eils, X.J. Guan, P.S., Meltzer, J.M. Trent, L. Langowski et T. Cremer (1996)**

Nuclear architecture and the induction of chromosome aberrations  
Mutation Research, 366, 81-96.

**3. Hilali, A., E.D. Léonard, G. Decat et A.Léonard (1991)**

An appraisal of the value of the contaminated Poisson method to estimate the dose inhomogeneity in simulated partial-body exposure  
Radiation Research, 128, 108-111.

**4. Léonard, A., Gh.Deknudt et E.D. Léonard (1988)**

Persistence of chromosome aberrations in an accidentally irradiated subject  
Radiation Protection Dosimetry, 22, 55-57.

**5. Léonard, A. et G. Gerber (2002)**

Kazakhstan, a legacy of misguided development  
Revue des Questions Scientifiques, 173, 39-53.

**6. Prosser, J.S., J.E. Moquet, D.C. Lloyd et A.A. Edwards (1988)**

Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes  
Mutation Research, 199, 37-45.

**7. Lloyd, D.C. et A.V. Sevankaev (1996)**

Biological dosimetry for persons irradiated by the Chernobyl accident  
European Commission, Final Report, EUR 16532 EN, 83 p.

### **Summary**

In the frame of a research contract supported by the European Commission and involving Belgian, Portuguese, Kazakh and Russian laboratories, some biological monitoring using cytogenetic techniques is presently performed in the Republic of Kazakhstan. The studies involve observations on population living in Semipalatinsk region where 450 nuclear assays occurred during the USSR period or around a lake in the vicinity of the Caspian Sea where wastes from a fast breeding reactor and uranium mines are stored.

### **Samenvatting**

In het kader van een onderzoekscontract, gefinancierd door de Europese Commissie, en in samenwerking met Belgische, Portugese, Kazachstanse en Russische laboratoria, onderzoeken worden ondernomen in Kazachstan doormiddel van verschillende biologische methodes, gebaseerd op cytogenische technieken. Deze onderzoeken worden bijvoorbeeld uitgevoerd op de bevolking die in Semipalatinsk wonen, waar meer dan 450 nucleaire testen werden uitgevoerd, en in omgeving van een stort in de nabijheid van het meer Caspienne waar afval wordt opgeslagen van een snel neutronen kerncentrale en deze van uranium mijnen.

## **CHROMOSOME ABERRATIONS IN PEOPLE LIVING IN REGIONS OF SEMIPALATINSK (KAZAKHSTAN) POLLUTED WITH RADIOACTIVITY**

**Akhmatullina<sup>1</sup> N.B., Gubitskaya E.G.<sup>1</sup>, Gerber G.B..<sup>2</sup>**

1) Institute of General Genetics and Cytology, Ministry of Education and Sciences,  
Republic of Kazakhstan (IGGC MES RK)

2) Université Catholique de Louvain, UCL 7237,  
Avenue E. Mounier 72, B1200 Brussels

### **Summary and Conclusions**

The use of the Semipalatinsk Testing Site over 42 years for more than 450 atomic bomb tests caused widespread contamination and exposure of populations in the regions of Semipalatinsk, Pavlodar, East Kazakhstan and Karaganda. In agreement with studies carried out in the past in the regions contaminated from the Chernobyl and Khytyhm accidents and near the Techa river, we observed an increase by a factor of about 2 of stable and unstable chromosome aberrations corresponding to a dose of 200-300 mSv. The increase is paralleled by a rise in the incidence of several diseases as well as of cancers and congenital malformations. After the termination of the tests, the aberration frequency decreased, especially with respect to chromosome, but not chromatid aberrations as would be expected when radiation was the causative factor.

### **Introduction**

Genetic damage in persons exposed to genotoxic agents, and in particular to ionizing radiation, is often evaluated on the basis of chromosome aberrations detected in circulating lymphocytes. The purpose of such "biomonitoring" is to assess the risks of cancer and other diseases related to genetic damage in somatic cells. The tests most often used are the determination of unstable aberrations e.g. polycentric chromosomes, of micronuclei and of stable aberrations. The latter are determined by means of FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) or G banding techniques. While unstable aberrations disappear with a half life of a few years, stable aberrations persist, possibly for the lifetime of the person. Retrospective evaluation of exposure many years after the incident is, therefore, not possible on the basis of unstable aberrations, although their determination is (still) easier and better standardized than that of stable ones and preferred for the early phase after an exposure. Both, stable and unstable translocations of parts of chromosomes are caused by two independent events of energy absorption and, therefore, display a linear-quadratic dose effect relationship for low LET radiation. Since repair can intervene between these events, the dose-effect relationship approaches linearity as the dose rate of an

exposure is reduced. The determination of chromosome aberrations allows detecting an acute radiation exposure of 100-200 mSv from an analysis of a few 1000 cells under optimal conditions and an adequate estimate of a dose of about 500 mSv.

Indeed, the analysis of chromosomal aberrations has proven its value for the evaluation of damage inflicted by an acute radiation exposure, but its usefulness is still uncertain for situations where relatively small exposures are delivered over long periods of time or where other confounding factors are present such as frequent X-ray examinations or contamination with other genotoxic agents. Contrary to what is sometimes believed - and then has resulted in unnecessary alarm - many genotoxic chemicals while being able to induce mutations and chromatid breaks cannot cause translocations.

The most extensive studies on persons living in areas contaminated with radioactive materials have been carried out in the neighborhood of the Chernobyl accident (1,2,3) and in the regions contaminated from the explosion at Kysthym and near the Techa river (4,5,6). The many diversified studies carried out in these regions gave rather variable results but suggested a slight trend for stable translocations to increase by a factor of about two corresponding to some 200-300 mSv of exposure. However, there seems to be a substantial spread of findings among laboratories carrying out the analysis and among persons assayed. The present paper deals with chromosomal aberrations observed in people living in an area contaminated with radioactivity from the Semipalatinsk atomic bomb tests.

### **1. Contamination and exposure near the Semipalatinsk atomic bomb test site.**

The large Semipalatinsk testing site in the North-East of Kazakhstan covers 18 500 km<sup>2</sup> that is more than the half the area of Belgium and, from 1949 until 1989, was used for more than 450 tests, among which 116 in open air. These tests have affected an area even larger than the testing site proper. Total activity of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr released amounts to 470 and 990 TBq respectively causing an increase in background radiation of 1.5 to 2 times and in certain areas up to 8 times. Pu-239 and other transuranium elements also have been released but their quantity is more difficult to assess and amounts to about 250 TBq. Air-gammaspectrometric and air-hydrochemical measurements have detected <sup>60</sup>Co, <sup>90</sup>Sr, <sup>137</sup>Zn, <sup>152/155</sup>Eu, <sup>239/240</sup>Pu and <sup>241</sup>Am.

The wide-spread contamination due to the tests was for a long period of time denied or belittled. A special group of scientists working in this region (7 see also 8, 9, 10, 11) reported that radioactive precipitations spread over a territory of 304 000 km<sup>2</sup> with a population of about 1.7 million people. In 711 settlements, the radiation dose was reported to have exceeded a “norm considered dangerous to people”. Radiation passports were issued in these settlements mentioning yearly integral and differential



doses as well as dates when radioactive clouds had passed. Thus, radioactive clouds passed through the village of Dolon in 1949, 1955, 1958, 1966, 1979, 1984 and 1989. In total, about 67 000 people were claimed to have received more than 1 Sv and a few even up to 4.5 Sv, but these estimates were later revised downward by a factor of ten times or more. Already the first ground nuclear explosion from 29 August 1949 caused 200 000 people to be irradiated with a dose from 100 to 250 R(12). During the period from 1949 to 1963, about 2 million people, that is 30-35% of all people in the Semipalatinsk region, were exposed to multiple external exposures; 500 000 of them received a dose of about 100 mSv. Exposure occurred not only from the passing cloud but also from persisting contamination of the ground. To give examples, a surface explosion contaminated soil at its epicenter with more than 27,900 Bq/kg of plutonium. At a distance of 1.1 km, soil activity was about 1,300 kBq/kg, and activity at a nearby village amounted to about 0.47-1.3 Bq/kg. Activities of <sup>90</sup>Sr and <sup>137</sup>Cs were in the order of 20 to 30 MBq at the epicenter and about as large at the “atomic” lake which formed near the epicenter. Nearby settlements received activities of about 40 kBq/kg of the nuclides. Presently, the radiation situation in Kazakhstan remains problematic, with spotty high radiation levels at the numerous land fills of radioactive and nuclear industrial facilities. In general, exposure of the population is low except for some people who steal material from underground tunnels or eat food grown on contaminated land, etc. Doses from such risky behavior are difficult to assess.

The Government of Kazakhstan has classified the territory according to the dose thought to have been received over the entire testing period into zones of:

1. Extreme radiation risk (more than 100 rem<sup>1</sup>);
2. Maximal radiation risk (35 to 100 rem);
3. Increased radiation risk (7 to 35 rem);
4. Minimal radiation risk (0.1 to 7 rem);
5. Territory with “preferential socio-economical status” (less than 1 rem).

The National Nuclear Center of the Republic of Kazakhstan (NNC RK), an agency established to investigate radiation pollution in the Republic after the test site had been closed, classified (13) potentially dangerous regions also according to the sources of exposure contamination resulting from

1. ground and air atomic bomb explosions;
2. excavation and underground explosions;
3. entry of water from mines and mine tailings;
4. effluents of contaminated water originating from highly contaminated areas.

---

<sup>1</sup> It should be recalled that 1 rem corresponds approximately to 10 mSv.

## **2. Morbidity and mortality among inhabitants living during and after atomic bomb tests near the site.**

The passage of the radioactive cloud, the persistent exposure from soil and from the ingestion of contaminated food caused noticeable health effects in the population. The President of the Kazakh association of International movement “Physicians for nuclear war prevention” Academician S.B. Balmuhanov (14) reported the results of the Semipalatinsk Medical Academy investigation jointly with the Institute of Radiation Medicine and Ecology on April 10, 1998 at an International non-governmental meeting. A total of 12,272 people were investigated, 6,860 of them had received 350 to 4,470 mSv; the control group consisted of 5,412 persons exposed to about 100 mSv, a value clearly higher than “normal” background. Morbidity from several diseases increased significantly in people born before 1963, i.e. in those exposed to radiation directly, thus about

1. six and a half times for diseases of the blood and the haemopoietic system;
2. 3.2 to 5.1 times for diseases of the nervous system and mental diseases;
3. two and half times for diseases of the skin and the endocrine system and of infectious or parasitic diseases;
4. twice for genito-urinary diseases.

Studies on later generations, i.e. those born from 1965 to 1980 in the second and even third (after 1980) generation after the termination of testing whose parents had been irradiated with doses from 900 to 4,470 mSv, show still excesses in morbidity by a factor of 1.5 to 2 times compared to the control group. Data of the Statistic Department on morbidity and mortality after 1995 remain worrying since they indicate that the morbidity in the Semipalatinsk region exceeds the average level in the Republic not only for the disease groups mentioned above but also for cancer. During 1996 to 2000, mortality amounted to 35-38 /  $10^5$  for children and to 13-14 /  $10^5$  for adults. Mortality from cancer diseases is also unusually high (200-230 /  $10^5$  ). During these years the number of congenital anomalies clearly increased, for instance in the Abay area, it reached 250-320 /  $10^5$  in 1999-2000.

### **3. Genetic consequences**

Several studies from different laboratories (18-23), including our own, dealt mainly with unstable aberrations in people living in the contaminated regions. The summarized results in table 1 show that, as has been found in other contaminated regions, the frequency of such aberrations increases slightly, although to a variable degree, about 2-3 times on the average compared to control groups. The spectrum of the modifications suggests that radiation, and not other factors are responsible for the changes. Thus, radioactive contamination is particularly high in the Abay district (Oblast); chemical beside radioactive pollution plays a role in settlements in the Pavlodar district where large industrial plants are situated.

Table 1. Chromosomal aberrations in inhabitants of different regions adjoining the testing site

Settlements	No persons studied	% cells with unstable aberrations	% withChromosome type aberrations,	% withChromatid type aberrations	Authors
<b>Oblast Semipalatinsk</b>					
Buras	23	3,2 0,17	2,1 0,14	1,5 0,18	Akhmatullina N.B.et al. (15)
Dolon	32	3,4 0,23	2,4 0,19	1,8 0,17	Gubitskaya E.G. et al. (16,17)
Kurchatov	13	3,3 0,29	1,85 0,38	1,77 0,22	
Mostic	14	3,3 0,27	2,3 0,24	1,7 0,32	
Sarjal	35	3,47 0,23	1,29 0,13	2,48 0,22	
Mostic	46	2,2 0,1	0,6 0,07	1,6 0,08	
Cheremuchki	26	2,15 0,15	0,60 0,12	1,55 0,1	
Karaul	28	3,9 0,37	2,3 0,33	1,8 0,22	
Kainar	16	4,2 0,35	3,4 0,33	1,2 0,20	Sevan=kaev A.V. et al.
Semipalatinsk	25	3,1 0,45	2,0 0,36	1,1 0,07	(18)
Chagan	11	3,5 0,39	1,8 0,24	1,1 0,19	Chaizhusunova N.Zh. (19)
Shulbinsk	11	4,8 0,46	2,5 0,33	2,7 0,35	
Semipalatinsk	11	3,2 1,2	2,41 0,69	0,79 0,29	Kundakbayeva G.B.et al. (20)
Beskaragaiskii region	50	4,87 1,14	3,87 0,49	1,5 0,53	
<b>Oblast Pavlodarskaya</b>					
Irtysk region	60	2,9 0,12	1,3 0,08	1,7 0,10	Vishnevskaya S.S.et al.(21) Sharipov I.K. et al.(22)
Sherbaktyn region	60	4,2 0,14	2,2 0,13	3,4 0,12	Chaizhusunova N.Zh. (19)
Maiskii region	40	3,4 0,23	2,5 0,45	2,2 0,21	
Maiskii region	9	3,7 0,3	1,9 0,36	1,9 0,29	
<b>Oblast Karaganda</b>					
	24	2,2 0,20	1,4 0,26	1,0 0,18	Bigaliev A.B.et al. (23)
<b>Control groups</b>					
Almaty city	10	1,3 0,2	0,5 0,13	0,83 0,17	Sharipov I.K. et al.(22)
Pavlodar town	30	2,0 0,25	0,4 0,14	1,6 0,28	
Akmolinskaya Oblast	15	1,53 0,23	0,75 0,16	0,87 0,13	Kundakbayeva G.B.et al. (20)
North-Kazakhstan Oblast	11	1,9 0,23	0,94 0,31	1,06 0,33	Chaizhusunova N.Zh. (19)

Another interesting aspect is the development of the cytogenetic changes with time. Since these unstable aberrations tend to disappear after exposure ceases, a trend to a decrease with time would be a strong indication that they had been a result of radiation exposure. From 1993 to 1998, we examined 220 nine to seventy four years old inhabitants of the region chosen at random and analyzed a total of 38,200 metaphases. These people - 40% men, 60% women - were all healthy at the time of blood sampling.

There were substantial fluctuations in the frequency of chromosome aberrations among individuals ranging from 0 to 8.5 %. It was, therefore, decided to classify the results into 3 groups: persons having

chromosome aberrations (a) up to 2 %, (b) from 2% to 5 % and (c) more than 5 % defining them respectively as “spontaneous”, “increased”, “high-level” cytogenetic instability. Similar classifications have been carried out by other groups (19-22).

Table 2. Quantitative indicators of cytogenetic instability in inhabitants of the Semipalatinsk region.

Year of examination	Number investigated of persons	Number/Percentage of persons with chromosome aberrations in groups:			Total number/percentage of persons exceeding the level of chromosome aberrations seen in controls (a)
		a	b	c	
1993	26	5/19	15/58	6/23	21/81
1995	67	18/27	41/61	8/12	49/73
1996	53	8/15	40/75	5/10	45/85
1998	74	45/61	28/38	1/1	29/39
Total	220	76/ 30.5_9.1	124/ 58_6.6	20/ 11.5_4.0	144 / 69.5_9.0

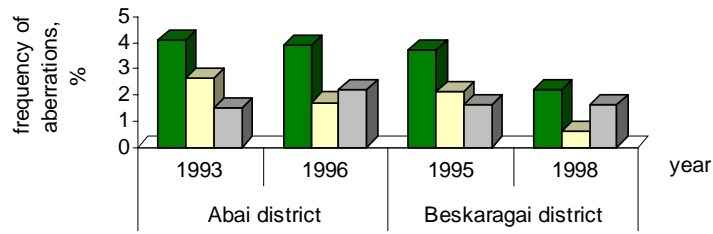
It can be seen from the table that the percentage of people falling into group (a) spontaneous level increased substantially in 1998 compared to the years 1993-1996 while that in the group (b) declined. The inhabitants of the Abay and Beskaragay districts of the Semipalatinsk region also show a reduction in 1998 from a higher level in 1993, 1995 and 1996 (Fig. 1). The reduction of chromosome aberrations with time seems to be more pronounced in the Beskaragay district ( 3.5 times) than in the Abay district (1.5 times) (Fig. 2). Indeed, the former district is thought to be less contaminated than the latter. The data also reveal a shift in the ratio of chromosome to chromatid aberrations. Whereas the number of chromosome aberrations type exceeded that of chromatid type aberrations in 1993 and 1995, this relation became inverted in 1996 and, even more so , in 1998. Since chromosome aberrations are mainly due to radiation, this change reflects the diminishing contribution of radiation exposure to the genetic load as the unstable aberrations are being eliminated with time.

## REFERENCES

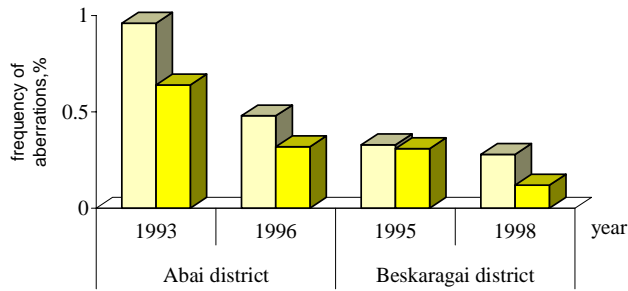
1. **Salomaa S, Sevan\_kaev AV, Zhloba AA, Kumpusalo E, Makinen S, Lindholm C, Kumpusalo L, Kolmakow S, Nissinen A.** Unstable and stable chromosomal aberrations in lymphocytes of people exposed to Chernobyl fallout in Bryansk, Russia. *Int J Radiat Biol* 1997, **71**: 51-59.
2. **Littlefield LG, McFee AF, Salomaa SI, Tucker JD, Inskip PD, Sayer AM, Lindholm C, Makinen S, Mustonen R, Sorensen K, Tekkel M, Veidebaum T, Auvinen A, Boice JD** Do recorded doses overestimate true doses received by Chernobyl cleanup workers? Results of cytogenetic analyses of Estonian workers by fluorescence in situ hybridization. *Radiat Res* 1998, **150**: 237-249.
3. **Verschaeve L, Domracheva EV, Kuznetsov SA, Nechai VV** Chromosome aberrations in inhabitants of Byelorussia: consequence of the Chernobyl accident. *Mutat Res* 1993, **287**: 253-259.
4. **Bauchinger M, Salassidis K, Braselmann H, Vozilova A, Pressl S, Stephan G, Snigiryova G, Kozheurov VP, Akleyev A** FISH-based analysis of stable translocations in a Techa River population. *Int J Radiat Biol* 1998, **73** 605-612.
5. **Testa A, Padovani L, Mauro F, Appolloni M, Anzidei P, Stronati L** Cytogenetic study on children living in Southern Urals contaminated areas (nuclear incidents 1948-1967). *Mutat Res* 1998, **401**: 193-197.
6. **Vozilova AV, Akleev AV, Bochkov NP, Katosova LD** Delayed cytogenetics effects of chronic irradiation of South Ural population. *Radiat Biol Radioecol* 1998, **38**: 586-590.
7. **Daukeev S. Zh.** Ecological safety B the basis of development of Semipalatinsk=s region, Proceedings of Intergovernmental organization meeting. Almaty. 10 April, 1998. 80-98.
8. **Government of Kazakhstan,** Semipalatinsk relief and rehabilitation programme, Situation report: needs assessment and priority project briefs, The Hearings of the European Parliament, Brussels February 2001.
9. **<http://www-erd.llnl.gov/library/JC-143920.pdf>** an article by the US Department of energy.
10. **<http://www.iaea.or.at/GC/gc40/documents/gc40inf5ac-6.html>** assessment of test sites by IAEA.
11. **Léonard A., Gerber G.** Kazakhstan, a legacy of misguided development, . *Revue des Questions Scientifiques*, 173, 39-58, 2002
12. **Boztayev K.B.** August 29 . Almaty. Publishing House “Atamura”. 1998, 163.
13. **Kadyrzhanov K.K., Lukashenko S.N.** Radioecological aspects of Kazakhstan development. Abstr.I Eurasia conference. on nuclear science and its application.23-27 October 2000. 75-77..
14. **Balmuhanov S.B.** Semipalatinsk Test Site: Medical and social consequences of nuclear tests, Proceedings of International nongovernmental organization meeting. Almaty. 10 April, 1998.
15. **Akhmatullina N.B., Gubitskaya E.G.** Cytogenetic investigations of inhabitants in STS region, Proceedings of National Academy of Science RK. 2001, **N2**: 62-65
16. **Gubitskaya E.G., Akhmatullina N.B., Vsevolodov E.B. et al.** Frequency of chromosomal aberrations in the population of Semipalatinsk oblast, *Russian Journal of Genetics*. 1999, **35**: 717-721
17. **Gubitskaya E.G., Akhmatullina N.B., Cherednichenko O.G. et al.** The cytogenetic`s effects among the population in districts bordering the Semipalatinsk nuclear test site. *Dokl. Inter.*

- Scientific Conf. Radiation safety and social-ecological problems of Kazakhstan. Karaganda. 1998. 190-195
18. **Sevan=kaev A.V., Ankina M.A., Golub E.V. et al.** Results of cytogenetic study of inhabitants of nearby settlements to Semipalatinsk Test Site, Radiation biology. Radioecology. 1995, **35**: 596-606
  19. **Chaizhusunova N.Zh.** The frequency of different types of chromosome aberrations in lymphocytes of peripheral blood in inhabitants living in nearby region to Semipalatinsk Test Site, "Health of people living in nearby region to Semipalatinsk Test Site". Collection of articles. Semipalatinsk. .207-210
  20. **Kundakbayeva G.B., Abildinova G.Zh., Svyatova G.S., Bigaliev A.B.** Cytogenetic effect in somatic cells of individuals exposed to chronic radiation in the period of nuclear tests on Semipalatinsk Test Site, Proceedings of the MS-AS RK. Series of biology and medicine. 1997.**N 4**. P. 6-11
  21. **Visnevskaya S.S., Sharipov I.K.,Vsevolodov E.B. et al.** Cytogenetic investigation of the ecological unfavorable districts of Pavlodar region. Proceedings of National Academy of Science RK. 1995. **N4**. P. 78-82
  22. **Sharipov I.K., Vishnevskaya S.S., Vsevolodov E.B., Slazhneva T.I.** Comparative investigation of some ecologically unfavorable regions in Kazakhstan by methods of ecological human cytogenetics, Proceedings of National Academy of Science RK. 1993, **N3**. 55-60
  23. **Bigaliev A.B., Krauss E.V.** Cytogenetic monitoring of inhabitants from ecologically unfavorable regions, Cytology and Genetics. 1992, **26**: 64-66

This review of the cytogenetic studies performed in the Semipalatinsk region has been prepared in the frame of contract ICA2-2000-10056 of the European Commission dealing with development of the consequences of pollution in Kazakhstan and in which Kazakh and Russian scientists participate.



**Figure 1 Development of cytogenetic in certain districts near the Semipalatinsk testing site, total aberrations ‘noir’, chromosome aberrations ‘blanc’, chromatid aberrations ‘gris’**



**Figure 2 Distribution of dicentrics ‘blanc’ and rings ‘gris’ in inhabitants near the Semipalatinsk testing site**



### **Résumé et Conclusions**

L'utilisation, pendant 42 ans, de la région du Semipalatinsk pour plus de 450 essais nucléaires, a provoqué l'exposition de larges fractions de la population non seulement du Semipalatinsk, mais aussi de tout l'est du Kazakhstan, de Pavlodar et de Karaganda, à une importante radiocontamination.

Tout comme cela avait été le cas après les accidents de Tchernobyl et de Khysthym et au voisinage de la rivière Techa, nous avons observé un doublement du taux d'anomalies chromosomiques stables et instables correspondant à une exposition à 200-300 mSv. Cette augmentation va de pair avec un accroissement de la fréquence de certaines maladies et du taux de cancers et de malformations congénitales. Lorsque les essais ont été terminés, on a observé une diminution progressive du taux d'anomalies de type chromosomiques mais non de type chromatidiques, ce qui était attendu pour des anomalies typiques d'une exposition aux radiations.

### **Samenvatting en Besluit**

Het uitvoeren van meer dan 450 nucleaire testen in de streek van Semipalatinsk gedurende 42 jaar, heeft de blootstelling veroorzaakt van grote delen van de bevolking en dit niet alleen in Semipalatinsk, ook in het oostelijk deel van Kazakhstan, in Pavlodar en in Kataganda is er een belangrijke radiocontaminatie opgetreden.

Zoals dit het geval was na de ongevallen van Tschernobyl en Khysthym en in die omgeving van de rivier Techa, hebben wij een verdubbeling geconstateerd van de stabiele en onstabiele chromosomale afwijkingen, die overeenkomen met een blootstelling van 200-300 mSv. Deze verhoging gaat samen met een toename van de frekwentie van een aantal ziektes, van het aantal kankergevallen en van congenitale afwijkingen. Eens de testen gestopt werden, hebben we een progressieve vermindering van het aantal afwijkingen waargenomen, in het bijzonder afwijkingen van het type chromosomaal, maar niet van het type chromatide, afwijkingen welke verwacht zouden worden als gevolg van blootstelling aan stralingen.

## **APPLICATION OF CYTOGENETIC RADIOSENSITIVITY ASSAYS IN BREAST CANCER PATIENTS AND TEMPORARY RADIATION WORKERS**

**Hubert Thierens<sup>1</sup>, Anne Vral<sup>1</sup>, Ans Baeyens<sup>1</sup>, Kim De Ruyck<sup>1</sup>, Leo De Ridder<sup>1</sup>, Marina Barbé<sup>2</sup>, Marc Meijlaers<sup>2</sup>, Kathleen Claes<sup>3</sup>, Ludwine Messiaen<sup>3</sup>**

- (1) Ghent University, Dept. An. Embr. Hist. Med. Phys & Dept Rad.Prot.  
Proeftuinstraat 86, B-9000 Gent
- (2) Occupational Medicine Service CBMT, Nuclear Power Plant Doel,  
Haven 1800, B-9213 Doel
- (3) Ghent University Hospital, Dept. Med. Gen.,  
De Pintelaan 185, B-9000 Gent

### **Abstract**

To assess the individual radiosensitivity cytogenetic techniques based on the scoring of chromatid aberrations ( G2 assay) and micronuclei in peripheral blood lymphocytes after in vitro irradiation were worked out. Application of the chromosomal radiosensitivity assays on breast cancer patients with a family history shows an enhanced radiosensitivity in more than 40 % of these patients indicating that low penetrance genes of the DNA repair mechanisms are also involved in the predisposition to breast cancer. A study of the chromosomal radiosensitivity of temporary workers involved in the overhaul of the reactors in Doel before and directly after the revision activities with the micronucleus assay shows a dose-dependent decrease of the radiosensitivity after the in vivo decrease pointing to an adaptive response phenomenon. However, this effect is not present in the G2 assay data indicating that the increased DNA repair responsible for the adaptive response is not lasting longer than a few days.

### **Introduction**

Breast cancer is the most common type of cancer in females accounting for approximately 18 % of all cancer cases in women worldwide. One of the strongest risk factors for breast cancer is a family history of the disease. For 5-10 % of all breast cancer patients mutations in the high penetrance genes BRCA1 and BRCA2 cause a strong genetic predisposition. However this cannot account for all patients with a family history so also other low penetrance genes have to be involved in the predisposition to breast cancer. On the other hand literature data point to an increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients in general [1]. To investigate if this increased chromosomal radiosensitivity has something to do with genetic predisposition to breast cancer we investigated the chromosomal radiosensitivity in a population of breast cancer patients with a family history.

External temporary radiation workers involved in the overhaul of reactors receive nowadays the highest dose in a relatively short period of time in the nuclear industry which can go up to 10 mSv in one month. During the interventions the doses are followed by electronic personnel dosimeters resulting in a well documented radiation history during the revision for this population. We performed a study of the chromosomal radiosensitivity of the external workers involved in the revision of the reactors of the Nuclear Power Plant Doel during 2000. To investigate a possible effect of the occupational exposure on the chromosomal radiosensitivity the radiosensitivity was assessed before and directly after the exposure.

### Cytogenetic methods

The radiosensitivity was assessed in lymphocytes in the G2 phase of the cell cycle with the G2 assay and in the G0 phase with the micronucleus (MN) assay.

For the G2 assay 1 ml blood was added to 9 ml culture medium with PHA as mitogen . After 71 h of incubation at 37 °C the cultures were irradiated with a 0.4 Gy <sup>60</sup>Co dose, 30 min later colcemid was added and the cultures were arrested 60 min after the irradiation. After staining, fifty metaphases were analysed on coded slides for the appearance of chromatid breaks and gaps.

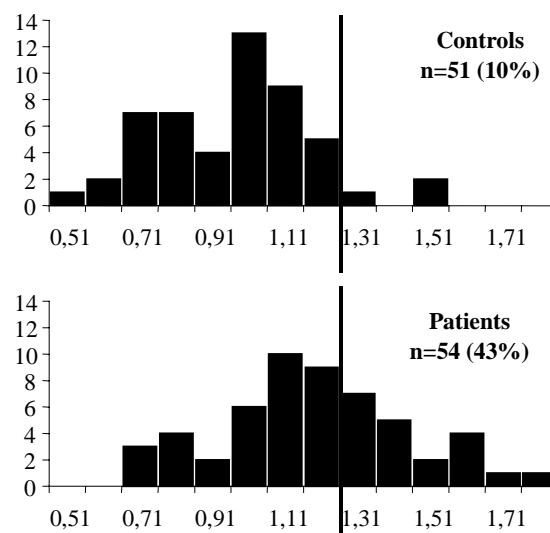
For the MN assay as radiosensitivity test 0.5 ml of blood was irradiated in vitro with a 3.5 Gy <sup>60</sup>Co dose and added to 4.5 ml culture medium with PHA as mitogen. At 24 h after PHA stimulation cytochalasin B was added to block cytokinesis. After 70 h of incubation at 37 °C the cells were harvested, treated with an hypotonic solution, fixed and stained with Giemsa. MN frequencies were scored in 1000 binucleated (BN) cells. One blood sample for the MN assay was irradiated at high dose rate (1Gy/min) (HDR-MN assay) and one at low dose rate ( 0.25 Gy/h) (LDR-MN assay). This allowed us to calculate the dose rate sparing (DRS) defined by the expression

$$DRS = ( 1 - Y_{LDR} / Y_{HDR} ) 100$$

with  $Y_{LDR}$  the MN frequency at low dose rate and  $Y_{HDR}$  the MN frequency at high dose rate. More detailed information on the cytogenetic methods for assessment of the chromosomal radiosensitivity can be found in [2]

### Breast cancer patient study

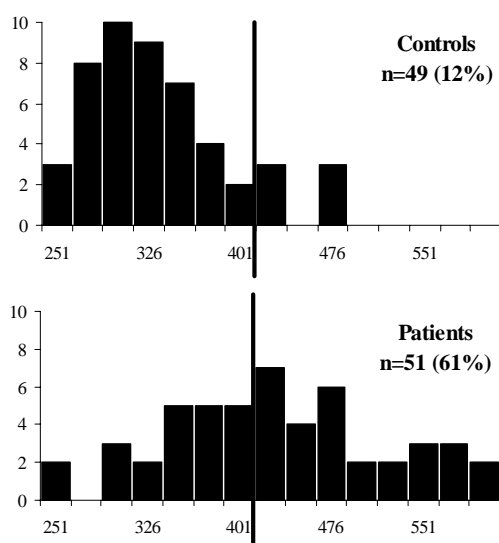
The breast cancer patients considered in this study were patients with a family history defined by three first degree relatives with breast cancer or by early onset before the age of 35 years. These patients were analysed for the presence of a BRCA1 or BRCA2 mutation by DNA sequencing. The control population consisted of 50 normal healthy women age-matched with the breast cancer population. As cut-off point for an increased radiosensitivity the 90<sup>th</sup> percentiles of the distributions of the cytogenetic endpoints for the control population was used. In figure 1 the data obtained with the G2 assay for the controls and the patients are compared. Using the the 90<sup>th</sup> percentile for the controls as cut-off point 43 % of the patients turned out to be radiosensitive.



**Figure 1:** Comparison of the G2 index between the control and breast cancer populations

For the LDR-MN assay the percentage of radiosensitive individuals in the patient population is even higher 61 % as illustrated in Figure 2. For the HDR-MN assay 45 % of the patients are radiosensitive. A study of the correlation of the G2 and MN results shows that only 10 % of the patients are sensitive in both assays. However, almost all patients that were radiosensitive with the HDR-MN assay are also sensitive with the LDR-MN assay.

The results of an analysis of the data for the subgroup of patients with BRCA mutations and for the young patients are summarized in Table I. According to these data the radiosensitivity of the patients with a BRCA mutation is clearly not higher than for the other breast cancer patients indicating that the observed radiosensitivity is not due to the BRCA1 or 2 mutations. On the other hand the effect is most pronounced in the young patients.



**Figure 2:** Comparison of the number of in vitro radiation induced micronuclei between the control and breast cancer populations

**Table I:** Data on the percentages of the populations showing an enhanced radiosensitivity with the G2 assay, the HDR-MN and the LDR-MN assays for the controls, the breast cancer population under study, the patients with a BRCA mutation and the young patients.

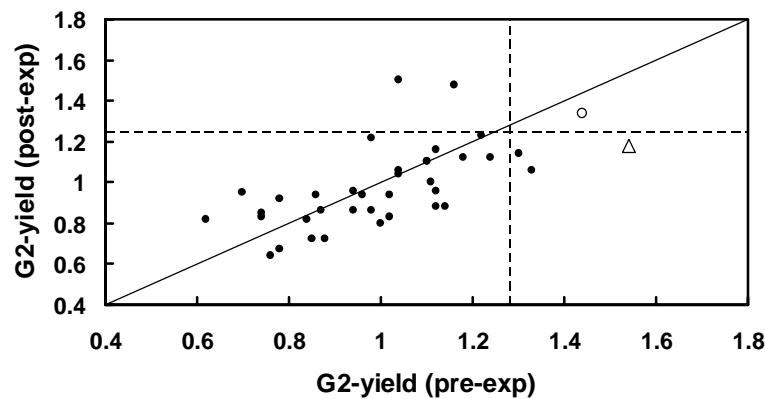
Population	G2	HDR-MN	LDR-MN
Controls	10	11	12
Patients	43	45	61
BRCA-mut	27	33	78
Age < 35 years	56	75	78

In conclusion, breast cancer patients with a family history show an enhanced chromosomal radiosensitivity and this effect is even more pronounced for young patients. This effect is not due to BRCA1 or 2 mutations. Our results indicate that low penetrance genes of the DNA repair mechanisms, responsible for the enhanced chromosomal radiosensitivity, are also involved in predisposition to breast cancer [3].

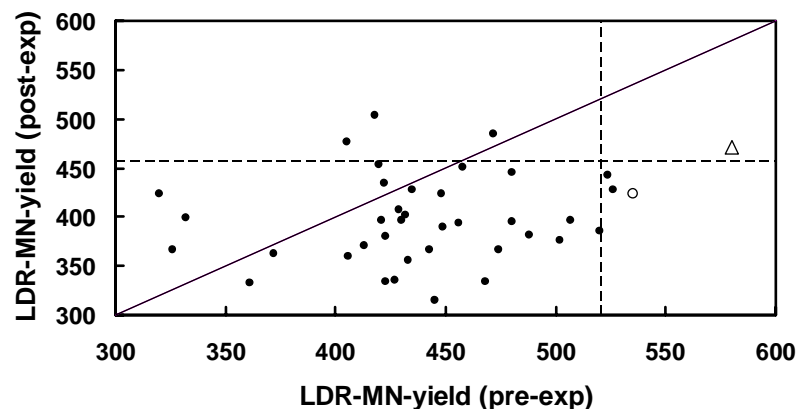
### Study of temporary workers

The population under study comprised 41 male contract workers temporary employed at the Nuclear Power Plant Doel (Electrabel, Belgium) for revision of the reactors Doel 1-4 during April-August 2000. For each individual the occupational exposure received during the annual maintenance in previous years was extracted from the official personnel dosimetry records (mean 13.9 mSv; range 0-68.7 mSv). Before blood collection, the workers were asked to fill in a questionnaire dealing with age, smoking habits, previous exposures to diagnostic X-rays as patient. The radiation dose received during the revision and cleaning activities was recorded on line with electronic personnel dosimeters (mean dose 3.0 mSv, range 0-9.5 mSv). From each worker a first blood sample was taken before the maintenance period, while a second blood sample was taken the day after the end of the period.

A comparison of the individual radiosensitivity measured with the G2 and the LDR-MN assay before and after the exposure is shown in Fig. 3 and 4 respectively.



**Figure 3:** Plot of the individual radiosensitivity data post-exposure versus the data pre-exposure for the G2 assay. The diagonal lines indicate no effect. The dashed lines indicate the cut-off point for enhanced radiosensitivity based on the criterion of the 90<sup>th</sup> percentile.

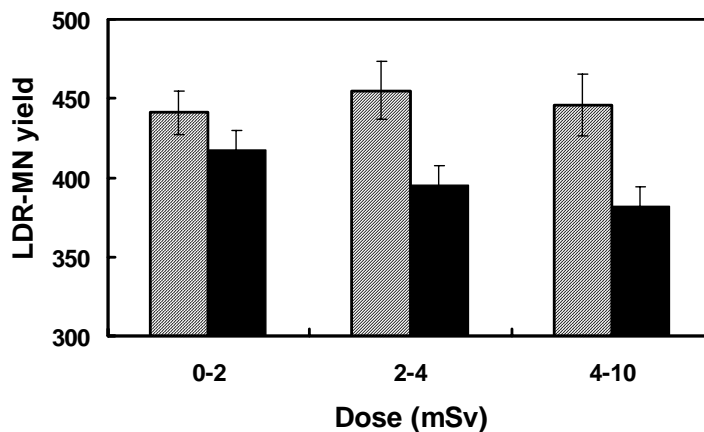


**Figure 4:** Plot of the individual radiosensitivity data post-exposure versus the data pre-exposure for the LDR-MN assay. The diagonal lines indicate no effect. The dashed lines indicate the cut-off point for enhanced radiosensitivity based on the criterion of the 90<sup>th</sup> percentile.

For the G2 assay a significant correlation between the data pre- and post-exposure was found ( $r = 0.74$ ). Applying the Wilcoxon test no significant difference is observed between the mean values of the number of G2 chromatids before ( $1.02 \pm 0.21$ ) and after the revision ( $0.99 \pm 0.20$ ). Using the 90<sup>th</sup> percentiles of the distributions as cut-off point for an enhanced radiosensitivity, one individual, indicated in Fig. 3 by the open circle, complies with this criterion both before and after the exposure.

The correlation between the data pre- and post-exposure for the LDR-MN assay is poor ( $r = 0.20$ ). Figure 4 shows a systematic shift to lower values after the exposure. For the mean LDR-MN yields a highly significant decrease is observed:  $400 \pm 45$  post-exposure versus  $445 \pm 58$  pre-exposure ( $p = 0.0002$ ). Using the 90<sup>th</sup> percentiles of the distributions as cut-off point one individual, indicated in Fig. 4 by the open triangle, complies with this criterion for the LDR-MN assay both before and after the exposure. This individual has also a high score with the G2 assay.

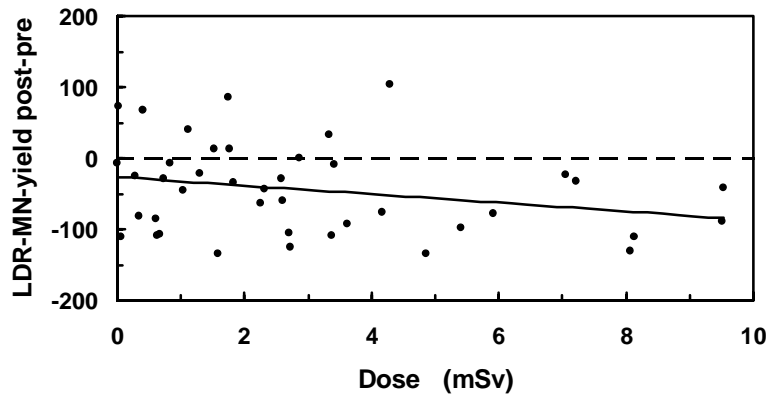
To investigate whether the observed decrease in the LDR-MN yields after the in vivo exposure are linked to this exposure the data were sorted into classes according to the radiation dose received during the study period (0-2 mSv, 2-4 mSv, 4-10 mSv). The results are shown in Fig. 5. For the highest dose range a statistically significant effect of the temporary exposure is observed. This effect is not present for the G2 assay data.



**Figure 5:** Comparison of the LDR-MN yields representative for the radiosensitivity before (hatched bars) and after (black bars) the occupational exposure for the workers sorted into exposure categories.

A plot of the individual differences between the LDR-MN results post minus pre exposure versus the received dose is shown in Fig. 6. A linear regression to the the LDR-MN data shows a systematic drop after the in vivo exposure with the dose as shown by the full line.

A similar analysis of the G2 data shows no effect of the occupational dose. From a combination of the LDR-MN and HDR-MN data can be deduced that the dose rate sparing is increased after the in vivo exposure.



**Figure 6:** Plot of the difference between post- and pre-exposure for LDR-MN assay data as a function of dose. The solid line is the result of a linear regression analysis.

In conclusion, our data confirm the results of Barquinero et al. [4] that an occupational exposure may act as an in vivo adaptive dose and increases DNA repair. That this effect is not observed in the G2 assay data may be due to the time span the effect remains effective: in the G2 assay the in vitro challenge dose is given after 4 days while in the MN assay the in vitro dose is given at the beginning of the cell culture. Another explanation may be that different DNA repair mechanisms are acting in the G0 (non-homologous end-joining) and G2 (homologous recombination) phase of the cell cycle.

In agreement with the UNSCEAR report [5] the results may not be interpreted as showing that the cellular adaptive response could induce beneficial effects that would outweigh the detrimental effects of low dose exposures. More detailed information on the in vivo kinetics of the adaptive response are needed for a better understanding of the biological consequences of low dose exposure [6].

## References

- [1] **SCOTT, D., BARBER, JBP., SPEADBOROUGH, AR., BURRILL, W., AND ROBERTS, SA.,** 1999, Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *International Journal of Radiation Biology*, **75**, 1-10.
- [2] **VRAL, A., THIERENS, H., BAEYENS, A. AND DE RIDDER, L., 2002,** The micronucleus and G2-phase assays for human blood lymphocytes as biomarkers of individual sensitivity to ionizing radiation : limitations imposed by intra-individual variability. *Radiation Research*, **157** , 472-477.
- [3] **BAEYENS, A., THIERENS, H., CLAES, K., POPPE, B., MESSIAEN, L., DE RIDDER, L. AND VRAL, A., 2002,** Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *British Journal of Cancer*, **87**, 1379-1385.
- [4] **BARQUINERO, J.F., BARRIOS, L., CABALLIN, M.R., MIRO, R., RIBAS, M., SUBIAS, A. AND EGOZCUE, J., 1995,**

Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, **67**, 187-191.

- [5] **UNSCEAR, 1994**,  
Sources and effects of ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation UNSCEAR 1994 Report to the General Assembly, Annex B Adaptive responses to radiation in cells and organisms, 186-259 (United Nations).
- [6] **SASAKI, M.S., 1995**,  
On the reaction kinetics of the radioadaptive response in cultured mouse cells. .  
*International Journal of Radiation Biology*, **68**, 281-291.

### **Résumé**

Pour déterminer la radiosensibilité individuelle, des techniques cytogénétiques ont été mises au point: le G2 essai basé sur le comptage des aberrations chromatides et le test micronoyau après une irradiation in vitro de lymphocytes. L'application des techniques cytogénétiques à une population de patients du cancer du sein avec une histoire de famille montre une radiosensibilité élevée dans plus de 40 % de ces patients. La conclusion est ici que plusieurs gènes impliqués dans la réparation de l'ADN jouent aussi un rôle dans la prédisposition pour le cancer du sein. Une étude de la radiosensibilité chromosomique dans une population de travailleurs temporaires employés pour la révision des réacteurs à Doel avant et immédiatement après l'exposition montre une réduction de la radiosensibilité après l'exposition. Cette décroissance dépend de la dose reçue indiquant l'effet de la réponse adaptative. La diminution n'est pas observée avec le G2 essai ce qui peut être expliqué par la nature temporaire de la réponse adaptative avec une durée de quelques jours.

### **Samenvatting**

Voor de bepaling van de individuele radiosensitiviteit werden cytogenetische technieken uitgewerkt, gebaseerd op het aantal chromatid aberraties ( G2 test) en het aantal micronuclei in perifere bloed lymfocyten na een in vitro bestraling. Toepassing van deze testen voor de chromosomale stralingsgevoeligheid op borstkankerpatiënten met een familiale belasting toont een verhoogde stralingsgevoeligheid in meer dan 40 % van deze patiënten. Dit wijst er op dat genen betrokken bij het DNA herstel na straling eveneens een rol spelen bij de genetische predispositie voor borstkanker. Een studie van de chromosomale stralingsgevoeligheid van tijdelijke werknemers, betrokken bij de revisie van de reactoren van het kernpark in Doel, vóór en onmiddellijk na de beroepshalve blootstelling met de micronucleus test toont een daling van de chromosomale stralingsgevoeligheid na de blootstelling. Deze afname is afhankelijk van de opgelopen dosis wat wijst op het adaptieve respons effect. Dat deze daling niet optreedt bij de gegevens van de G2 test kan worden verklaard door het tijdelijk karakter van het adaptieve respons effect met een duur van enkele dagen.



## LES TRAVAUX DE NORMALISATION EN DOSIMETRIE BIOLOGIQUE

**Philippe VOISIN**

Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire,  
BP17, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. Mel : philippe.voisin@irsn.fr

### **Introduction :**

L'utilisation fréquente de sources radioactives et d'appareils à rayons X pour des applications médicales, industrielles, pour l'agriculture, la recherche et l'armée augmente le risque de surexposition des travailleurs et personnes du public. La dosimétrie biologique, basée sur l'étude des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes circulants, essentiellement la technique cytogénétique utilisant les dicentriques, est devenue un élément de routine pour l'estimation dosimétrique en cas de surexposition accidentelle. L'expérience acquise par son utilisation dans des centaines de cas de surexpositions suspectées ou avérées a prouvé la valeur de cette méthode et a également défini ses limites. Il faut souligner que l'analyse cytogénétique est utilisée comme un dosimètre et, en complément des symptômes cliniques et de la reconstitution physique, fournit un élément d'information essentiel à l'évaluation de la sévérité d'un accident radiologique.

De nombreuses études chez l'animal et l'Homme ont montré qu'il était possible d'établir une bonne corrélation entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*. Les relations dose-effet établies *in vitro* sur des échantillons de sang irradié peuvent être utilisées comme courbes d'étalonnage. Le taux de dicentriques dépend du type de rayonnement et du débit de dose : les informations relatives à ces paramètres doivent donc être précisées pour chaque expertise.

La spécificité de cette technique est renforcée par le fait qu'on observe en général 1 dicentrique pour 1000 métaphases dans la population normale, et que cette fréquence est apparemment indépendante de l'âge et du sexe. La précision de la technique dépend donc du nombre de cellules observées, du taux de base et de la courbe d'étalonnage utilisée. En théorie, il est possible de détecter des expositions aussi faibles que 0,01 Gy. Toutefois, pour ces très faibles doses, il est nécessaire d'analyser des milliers de métaphases. En pratique, ce niveau de détection n'est ni faisable ni nécessaire. La limite supérieure de détection en dose est bien au-delà du niveau de dose létale pour les humains.

L'importance prise par la dosimétrie biologique dans le suivi des surexpositions des travailleurs et du public aux rayonnements ionisants a justifié dans certains pays sa prise en compte au niveau réglementaire. En France, par exemple, la place de la dosimétrie cytogénétique est spécifiquement inscrite dans les textes de loi relatifs à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants ainsi que dans les circulaires de la direction générale de la santé, relatives à la surveillance et au traitement des malades irradiés (Figure 1).

- ❑ **Décret N°86-1103 du 2 Octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants,**
  - ❑ **Circulaire DGS 3A / 3E / 1102 du 29 Septembre 1987, définissant l'organisation des soins médicaux le premier jour après un accident radiologique ou nucléaire.**
- remplacée par la*
- ❑ **Circulaire DHOS/HFD/DGSNR N° 277 du 2 mai 2002 relative à l'organisation des soins médicaux en cas d'accident nucléaire ou radiologique**
  - ❑ **Circulaire DGS 3A / 3B / 514 du 6 Décembre 1988, relative à la surveillance et au traitement des patients irradiés.**

Figure 1 : Textes réglementaires régissant en France l'utilisation de la dosimétrie biologique en cas d'exposition, supposée ou avérée, aux rayonnements ionisants

Ces textes précisent entre autres, que le médecin en charge du ou des patient(s) irradié(s) peut demander dans les heures qui suivent la surexposition accidentelle une dosimétrie biologique (appelée analyse cytogénétique dans les textes), qui fait partie de l'ensemble des examens biologiques (numération formule sanguine, HLA, etc...) et cliniques susceptibles d'être demandés par le médecin. Il est également précisé que cet examen a valeur médico-légale pour les travailleurs exposés aux rayonnements ionisants. Enfin, l'ensemble des examens biologiques et cliniques doit être conservé au moins 30 ans par le médecin traitant, ce qui suggère en contrepoint, que le laboratoire de service doit conserver les matériaux qui ont permis de mener l'expertise (feuilles de résultats et préparations microscopiques) au moins le même laps de temps.

Même si le nombre de cas de réelle irradiation est heureusement limité, la dosimétrie biologique est souvent sollicitée pour des suspicions d'irradiation, ce qui implique qu'il existe généralement un laboratoire de dosimétrie biologique par pays industrialisé. On voit que l'utilisation d'une technique aussi largement admise doit reposer sur des bases solides, pour assurer sa crédibilité. Ses points critiques se situent en fait à deux niveaux de son application :

- au niveau méthodologique
- au niveau réglementaire

#### **Approche méthodologique :**

Le dénombrement des aberrations chromosomiques de type dicentrique s'effectue dans les lymphocytes T présents dans le sang périphérique, au cours de leur première division. Le sang nécessaire à l'expertise dosimétrique est donc recueilli sur de l'héparine de lithium comme anticoagulant pour permettre la culture des lymphocytes.

Les échantillons sanguins sont ensuite traités de différentes manières selon les laboratoires, mais le protocole utilisé est globalement proche de ceux décrits dans les rapports techniques n°260 et 405 de l'AIEA (figure 2). La mise en culture des lymphocytes est effectuée en diluant une aliquote de sang total dans un milieu de culture approprié, par exemple du RPMI

1640, additionné de 10% de sérum de veau foetal, de phytohemagglutinine comme stimulateur mitotique et d'antibiotiques. Après 46 heures de culture à 37°C, un inhibiteur mitotique (colcémide) est ajouté et la culture prolongée de 2 heures. Les cellules sont recueillies par centrifugation, soumises à un choc hypotonique ; les globules rouges sont lysés et les lymphocytes fixés par trois additions successives d'un mélange d'acide acétique/méthanol. Les métaphases sont étalées par projection sur des lames de microscope propres et humides et visualisées par un colorant spécifique de l'ADN (giemsa). Les aberrations chromosomiques instables (dicentriques, anneaux centriques et fragments) sont dénombrées au microscope à fort grossissement (x1000), uniquement dans les métaphases complètes (avec 46 centromères). La correspondance entre la fréquence des dicentriques et l'estimation de la dose intégrée au corps entier est obtenue par une courbe dose-effet, établie en exposant du sang *in vitro* à un rayonnement de référence. Le nombre de cellules observé est fonction de nombreux critères, parmi lesquels la qualité des étalements, le nombre de dicentriques par cellule et la précision statistique demandée.

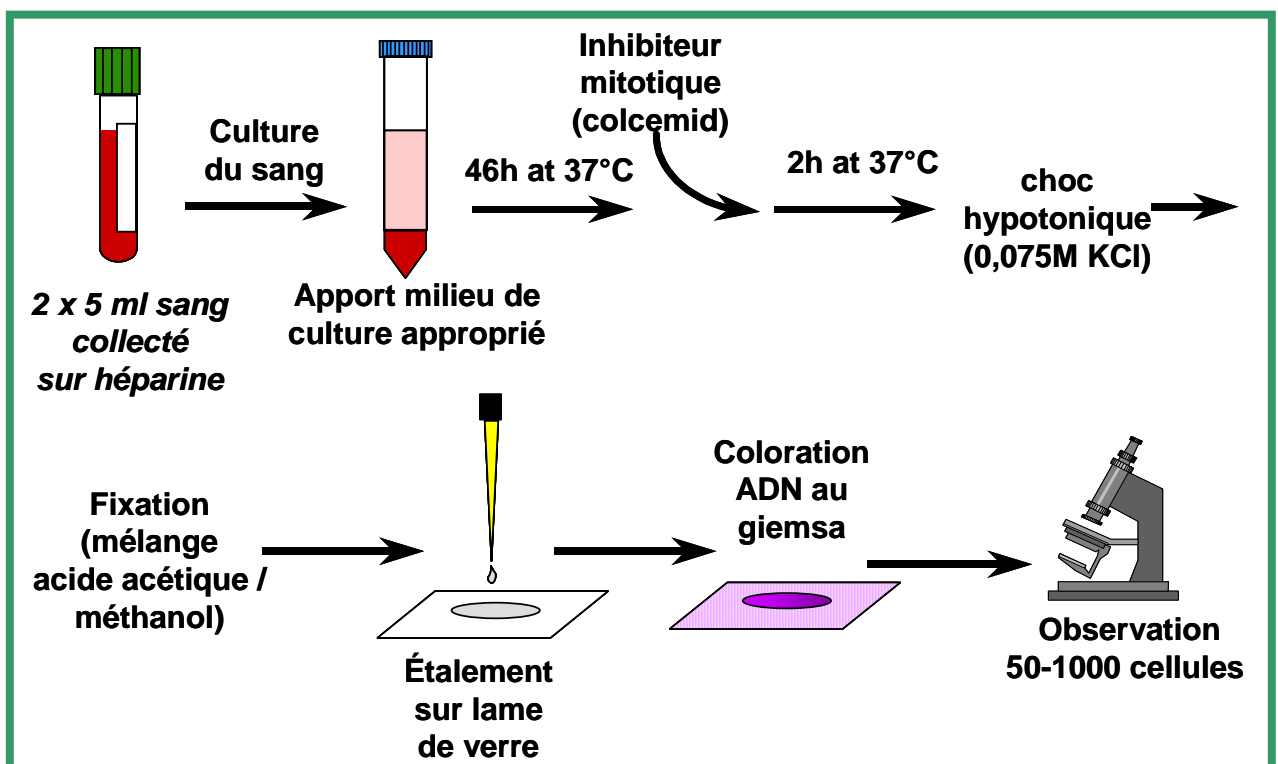


Figure 2 : Représentation schématique de la technique utilisée classiquement pour traiter un prélèvement sanguin afin de dénombrer les aberrations chromosomiques instables (dicentriques, anneaux centriques et fragments) radio-induits dans les lymphocytes T périphériques à des fins de dosimétrie biologique (cytogénétique conventionnelle)

### Approche réglementaire :

La configuration d'un accident d'irradiation est multiple par son origine et unique par essence. Sa découverte n'a pas lieu obligatoirement dans les minutes qui suivent l'irradiation (quoique que ce soit le cas le plus fréquent) mais peut simplement résulter du contrôle mensuel du dosifilm. Dès la découverte de la suspicion, l'individu potentiellement irradié est généralement examiné par un médecin, qui peut être un médecin généraliste, un médecin du travail ou un médecin d'un service hospitalier spécialisé (en France, l'Institut Curie essentiellement). Cette consultation va permettre un examen clinique à la recherche d'une

symptomatologie particulière de l'irradiation et un interrogatoire précis sur les circonstances de l'accident. Un certain nombre d'examen biologiques vont être demandés, ainsi qu'une reconstitution dosimétrique. Le prélèvement sanguin pour la dosimétrie biologique sera pratiqué dès que possible, en accord avec le laboratoire de service qui fournit toute indication utile sur la méthodologie de prélèvement et le transport des tubes. Dès la fin de l'analyse des prélèvements sanguins, le médecin prescripteur est averti du résultat et un rapport écrit lui parvient, comportant divers renseignements administratifs, le nombre de cellules examinées, la description des anomalies chromosomiques retrouvées, la dose correspondante sur la courbe de référence du laboratoire ainsi que des observations spécifiques à l'accident. Finalement, la confrontation des informations cliniques, physiques et biologiques permettra d'aider le médecin dans sa stratégie thérapeutique.

Il faut cependant préciser que dans certains pays comme le Canada ou les Etats-Unis, des particuliers peuvent directement demander une expertise en dosimétrie biologique au laboratoire de service sans passer par une autorité médicale.

Malgré l'apparente simplicité de la technique et l'homogénéité de la pratique pour l'estimation de la dose en cas d'exposition aux rayonnements ionisants, telle que décrite ci-dessus, on est amené à constater un certain nombre de disparités dans l'usage qu'il en est fait. Ainsi, au niveau méthodologique :

- Même si la dosimétrie biologique par cytogénétique n'est qu'une adaptation un peu particulière des techniques classiques en cytogénétique, aucun laboratoire n'utilise vraiment le même protocole ;
- Il existe des variations sensibles dans les méthodes de dénombrement des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes et dans le nombre de cellules observées ;
- Des différences peuvent être notées dans l'analyse des résultats, à plus forte raison si l'exposition a été relativement complexe. Il faut préciser que le dénombrement des dicentriques fonctionne au mieux quand l'irradiation est homogène et relativement récente. En cas d'exposition hétérogène ou ancienne, des modèles mathématiques sont proposés sur une base généralement empirique ou expérimentale.
- Certains laboratoires rendent des estimations de dose à partir de courbes dose-effets publiées dans la littérature scientifique, sans tenir compte des spécificités de leur propre méthodologie et donc en augmentant l'erreur de mesure.

Cela se traduit par des difficultés pour comparer les résultats d'un laboratoire à l'autre, même si heureusement les différences sont rarement significatives. Cela pose aussi le problème de l'homogénéité des résultats lors d'études communes menées conjointement par plusieurs laboratoires, au travers par exemple de programmes de recherche internationaux.

Si, maintenant, on passe au niveau réglementaire :

- il n'y a donc aucune méthode de référence « normalisée » pour la dosimétrie biologique par cytogénétique, comme il peut y avoir des méthodes de référence pour mesurer la contamination interne en radionucléides, ou plus simplement pour mesurer le taux de glucose sanguin. Il faut souligner d'emblée, le travail considérable effectué par l'AIEA au travers de ses manuels techniques, pour justement apporter un maximum d'homogénéité dans les méthodes utilisées en dosimétrie cytogénétique ;
- il n'y a aucun contrôle de qualité clairement défini ni aucun programme d'assurance qualité interne et externe permettant d'assurer de manière univoque et en tous temps la qualité des résultats fournis.

- Il n'y a aucun réseau national ou international de laboratoires de référence, permettant d'assurer la continuité des contrôles de qualité, au travers par exemple d'intercomparaisons internationales : seul existe un réseau collaboratif constitué par affinité.

Il faut relativiser ce constat apparemment négatif : la dosimétrie biologique par cytogénétique pratiquée par de nombreux laboratoires, même si elle ne remplit pas toutes les conditions fixées ci-dessus, est tout à fait respectable et digne de confiance. Mais il y a aussi d'autres laboratoires qui veulent s'initier à la dosimétrie biologique et auxquels il faut pouvoir fournir un cadre d'activité clairement défini.

Aussi, afin de s'aligner sur des pratiques déjà existantes dans d'autres domaines de la biologie n'appartenant pas au domaine de la radioprotection, il a semblé nécessaire à un certain nombre de spécialistes de dosimétrie biologique de se réunir afin de clarifier les éléments décrits ci-dessus et les introduire dans un cadre « normatif » homogène, utilisable par n'importe quel laboratoire dans le monde.

Ainsi que rappelé plus haut, l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique a publié un rapport technique sur la dosimétrie cytogénétique en 1986 qui vient d'être remplacé par une édition revue et augmentée en 2001. Ces rapports apportent des informations utiles sur l'analyse des dicentriques, couvrant ses avantages et limitations, les domaines d'application, fournissant des protocoles de laboratoire, détaillant l'analyse statistique, et donnant des conseils pragmatiques pour des circonstances d'accident particulières. Même s'ils constituent les documents de référence les plus complets dans cette discipline, ils n'abordent cependant pas les questions d'assurance de la qualité et du contrôle de la qualité, l'accréditation du laboratoire de service et l'évaluation des performances. De plus, l'AIEA émet des recommandations, qui, bien que pertinentes, ne sont donc pas des exigences.

L'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) constituait un cadre plus approprié au développement d'un tel ensemble de règles communes. Cela tient à la méthode particulière par laquelle les normes sont développées au sein de l'ISO :

- consensus
- participation la plus large possible de tous les acteurs intéressés, que ce soit les utilisateurs, les scientifiques, les industriels
- volontariat

La création d'un nouveau groupe de travail sur la normalisation de la dosimétrie biologique par cytogénétique a donc été proposée en 1998, puis acceptée en 1999, au sein du technical committee 85 « Nuclear Energy » au niveau du sub-committee 2 « radiation protection ».

Le groupe de travail comprend 14 spécialistes de 12 pays, plus un représentant de l'AIEA et un de l'OMS. Le premier texte préparé par ce groupe a pour titre « standard criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics (quality assurance and control, evaluation of performance) ».

Il a été soumis une première fois aux pays membres du sous-comité 2 de l'ISO comme « working draft », puis après avoir satisfait aux corrections demandées, il a été resoumis à l'ensemble des pays membres de l'ISO comme Draft International Standard (DIS) à la fin 2002.

## Structure actuelle du document de l'ISO

Dans son état actuel de développement, le document est divisé en 11 chapitres et 4 annexes (figure 3).

No	Chapter Title
1	Scope
2	Terms and definitions
3	Confidentiality of personal information
4	Laboratory safety requirements
5	Calibration source(s), calibration dose ranges, and minimum detection levels
6	Responsibility of the customer
7	Responsibility of the service laboratory
8	Scoring unstable chromosome aberration
9	Criteria for converting a measured aberration frequency into an estimate of absorbed dose
10	Reporting of results
11	Quality assurance and quality control

No	Annexes Title
1	Questionnaire – data of suspect exposed persons (exposure conditions, sampling time, sex, age, medical history)
2	Instructions for customers (requesting biodosimetric assessment)
3	Example of scoring sheet
4	Example of report

Figure 3 : synopsis du projet de norme ISO : “Standard criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics (Quality assurance and control, evaluation of performance)”

Le chapitre 1 explique le cadre et la portée de la norme et le chapitre 2 définit les termes spécifiques employés dans le texte.

En considérant les conséquences potentiellement sérieuses de la surexposition aux rayonnements ionisants, le chapitre 3 développe la notion de confidentialité en ce qui concerne :

- La transmission de données confidentielles concernant le patient et les circonstances de l'exposition, par le médecin représentant le patient (ou le patient lui-même dans certains pays) au laboratoire de service ;
- L'anonymat de l'échantillon de sang et la confidentialité des résultats et du rapport ;
- La délégation de confidentialité au sein du laboratoire.

Un autre sujet important sont les risques potentiels encourus par le personnel de laboratoire pendant le traitement d'un échantillon de sang potentiellement infectieux. Bien que ce problème n'est pas spécifique à la dosimétrie biologique, il est apparu essentiel de souligner, dans le chapitre 4, les exigences minimales de sécurité, pour les risques microbiologiques, chimiques et optiques.

Nous avons expliqué dans l'introduction de ce papier que l'établissement d'au moins une courbe de référence spécifique au laboratoire de service est une condition essentielle pour l'évaluation de dose. En effet, cette courbe doit être produite par les mêmes protocoles que ceux employés par ce laboratoire pour son expertise. À cette fin, le chapitre 5 définit les conditions dans lesquelles ces courbes dose-effet doivent être établies, par exemple la nature de la source physique, les gammes de dose et le niveau de détection minimum.

Puisque le laboratoire de service ne contrôle pas certaines conditions opératoires initiales, comme la qualité du prélèvement de sang et les conditions d'expédition, il doit clairement exposer au demandeur sa responsabilité dans cette phase préparatoire à l'analyse biologique. Par contre, le laboratoire de service est responsable de toutes les phases qui suivent la réception du prélèvement, depuis la culture jusqu'au dénombrement des aberrations, l'estimation de la dose et, finalement, du rapport qui est écrit et/ou approuvé par un expert qualifié. Ces aspects sont soulignés dans des chapitres 6 et 7, traitant de "la Responsabilité du Client" et de "la Responsabilité du Laboratoire de Service".

Les chapitres 8 et 9 sont consacrés aux aspects spécifiques de la technique cytogénétique. Le groupe de travail a jugé inutile de reproduire le matériel déjà décrit dans les rapports techniques l'AIEA, ou d'introduire un protocole en particulier comme étant le seul à employer dans toutes les circonstances. À l'inverse, il lui a paru utile d'introduire un certain formalisme auquel l'AIEA n'est pas tenu. Aussi, les chapitres 8 et 9 définissent les exigences minimales à satisfaire pour que la technique employée par le laboratoire de service soit acceptable au vu de la norme. Plus précisément, le chapitre 8 décrit les points marquants de la procédure pour obtenir des métaphases de première division et indispensables pour un dénombrement correct des aberrations chromosomiques instables. Le chapitre 9 récapitule les questions statistiques liées à la conversion des fréquences d'aberrations chromosomiques en une évaluation de dose, particulièrement quand l'exposition est autre que aiguë et uniforme.

Suite logique de l'expertise, le rapport de laboratoire doit reproduire toutes les informations fournies par le demandeur qui, liées aux circonstances accidentelles ou au patient, peuvent influencer sur l'interprétation des données brutes. Toutes les aberrations trouvées au cours de l'analyse des préparations biologiques doivent y être inscrites et sont interprétées selon la compréhension contemporaine des mécanismes de formation des aberrations chromosomiques radio-induites. Le chapitre 10 identifie les points-clés devant être inclus dans un rapport de laboratoire de service.

La plus grande originalité de la norme, réside dans la description détaillée du programme d'assurance de la qualité qui doit accompagner l'expertise du laboratoire de service.

Les exigences fondamentales pour un programme complet d'assurance de la qualité de la mesure incluent :

- La conformité avec les exigences générales opérationnelles établies selon des critères écrits;
- Un programme interne d'assurance de la qualité bien documenté;
- Des évaluations de performance périodiques, incluant des tests de compétence et des expertises, internes et externes;
- Un programme de contrôle de la qualité établi selon des procédures écrites pour les services rendus aux demandeurs.

Le laboratoire de service aura un plan écrit d'assurance de la qualité afin de garantir sa conformité avec les procédures, instructions et règles existantes, notamment pour tout ce qui concerne ce qui est contenu dans les chapitres décrits ci-dessus.

Le contrôle de la qualité interne doit inclure les vérifications suivantes des performances du laboratoire :

- Systèmes de mesure et utilisation de standards de référence traçables;
- Observation des différentes étapes de l'expertise et évaluation du contrôle de qualité pour s'assurer de la cohérence à long terme des résultats;
- Évaluation de la conformité aux critères d'exécution de cette norme;
- Vérification de la détermination du seuil limite de détection.

Une stratégie de contrôle de la qualité externe est suggérée sous forme d'intercomparaison : (1) prélèvements sanguins exposés *in vitro* à des caractéristiques connues de rayonnement, envoyés par un laboratoire de référence au laboratoire en test pour analyse (traçabilité implicite); (2) prélèvements sanguins exposés *in vitro* à des caractéristiques inconnues de rayonnement, échangés entre deux ou plusieurs laboratoires dont le laboratoire de référence et le laboratoire en test, et analysés conjointement (traçabilité explicite).

Le Chapitre 11 inclut donc la description de ce plan d'assurance de la qualité qui doit comprendre une procédure interne pour assurer le suivi à long terme de l'expertise et un programme de référencement externe.

En annexe de ce projet, le groupe de travail a souhaité inclure 4 documents essentiels à l'expertise de dosimétrie biologique par cytogénétique : un formulaire instruisant le demandeur sur ses responsabilités et sur les conditions de prélèvement et d'envoi de l'échantillon biologique ; un questionnaire-type permettant au laboratoire de service d'obtenir les informations utiles sur l'accident et sur le patient, une notice technique aidant au dénombrement des aberrations chromosomiques ; enfin un modèle de rapport. Tous ces documents sont inclus pour guider des laboratoires de service dans la formulation de leurs propres documents.

### **Conclusion**

La norme décrite dans ce papier en est à sa phase terminale et pourrait entrer en vigueur à l'horizon 2005. Il est espéré qu'elle convaincra par son approche pragmatique, les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique ou désirant acquérir cette technique, de l'intérêt d'une standardisation, qui leur apporte une crédibilité supplémentaire en prouvant ainsi leur compétence.

### **Références**

#### **IAEA**

Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment  
*In: Technical Reports Series, IAEA, Vienna, 1986, N°260.*

#### **IAEA**

Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment, A Manual.  
*In: Technical Reports Series, IAEA, Vienna, 2001, N°405.*



**P. VOISIN, F. BARQUINERO, B. BLAKELY, C. LINDHOLM, D. LLOYD, C. LUCCIONI, S. MILLER, F. PALITTI, P.G.S. PRASANNA, G. STEPHAN, H. THIERENS, I. TURAI, D. WILKINSON, A. WOJCIK**

Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics.  
Cellular and Molecular Biology, 58, 501-504 (2002).

### **Remerciements**

Je tiens ici à remercier les membres du Working Group 18 « Dosimétrie Biologique par Cytogénétique » de l'ISO pour leur participation active à la rédaction de la future norme que décrit ce papier : F. Barquinero (Espagne) ; B. Blakely (Etats-Unis) ; I. Hayata (Japon) ; C. Lindholm (Finlande) ; D. Lloyd (Royaume-Uni) ; C. Luccioni (France) ; S. Miller (Canada) ; F. Palitti (Italie) ; P. Prasanna (Etats-Unis) ; G. Stephan (Allemagne) ; H. Thierens (Belgique) ; I. Turai (AIEA, Vienne) ; D. Wilkinson (Canada) ; A. Wojcik (Pologne).