

УДК 576.316:616-001.28:575.224.4

ВИЗНАЧЕННЯ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТІВ ГОСТРОЇ ПРОМЕНЕВОЇ ХВОРОБИ ПРИ СУМІСНІЙ І ОКРЕМІЙ ДІЇ МУТАГЕНІВ РАДІАЦІЙНОЇ ТА ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ

Л. Р. Педан

ДУ “Національний Науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, м. Київ

Ключові слова: *хромосомна нестабільність, гостра променева хвороба, мутагени.*

У віддалені строки після променевого ураження людини провідне значення для реалізації стохастичних і деяких нестохастичних медичних наслідків опромінення мають не стільки прямі цитогенетичні ефекти в безпосередньо опромінених клітинах-мішенях (більша частина яких вже елімінувалася), як так звані “немішеневі” ефекти, зокрема, різні форми радіаційно-індукованої нестабільності геному — феномена, при якому з плином часу в клітинах акумулюються множинні зміни, що сприяють переходу стабільного геному нормальних клітин до нестабільного геному, характерного, зокрема, для пухлинних клітин [1, 2]. На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному людини відіграє т. з. прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи аберантному каріотипі, яка проявляється як підвищення чутливості хромосом соматичних клітин до дії інших мутагенів (*in vivo* та *in vitro*), що розцінюється як схильність до індукції та промоції первинної онкопатології, а також до виникнення та розвитку вторинних пухлин [2–4].

Враховуючи актуальність цієї проблеми, метою нашого дослідження було визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини у віддалені строки після радіаційного впливу.

Для вивчення характеру мутагенного ефекту в соматичних клітинах людини при сумісній і окремій дії іонізуючого опромінення і хімічного мутагенного фактора, а також для оцінки стабільності геному в осіб, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, при цитогенетичному об-

стеженні опромінених осіб проводили додаткову обробку культури лімфоцитів периферичної крові мутагенами-провокаторами *in vitro*.

Матеріал та методи. Провели добровільне цитогенетичне обстеження 5-ти осіб з групи порівняння (умовно здорові донори, 4 жінки, 1 чоловік у віці 20–46 років), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами, та 4-х осіб з радіаційним впливом великої інтенсивності (реконвалесценти гострої променевої хвороби (ГПХ) через ~ 20 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження, всі чоловіки у віці 41–73 роки).

В обстежених осіб визначали фонові та індуковані радіаційним і хімічним мутагенами (сумісна і окрема дія) частоти всього спектра хромосомних аберацій в культурі лімфоцитів периферичної крові. Лімфоцити культивували за стандартним напівмікрометодом в нашій модифікації [5, 6].

При приготуванні препаратів метафазних хромосом інтактну культуру інкубували протягом 48–50 годин (останні 2 години — з колхіцином), що дозволяло досліджувати клітини, основна маса котрих знаходилась у першому мітозі.

Для тестуючої обробки культур лімфоцитів використовували мутаген-провокатор діматіф (дітиленімід амідотіо-фосфорної кислоти), котрий вводили в культуру лімфоцитів в оптимальній концентрації (0,4 мкг/мл), яка індукує вірогідний цитогенетичний ефект без множинних хромосомних аберацій та практично не пригнічує мітотичну активність культури. Діматіф вводили на G₁ (постсинтетичній) стадії мітотичного циклу (через 2 години від початку інкубації) і залишали до кінця культивування. Через затримку мітотичного циклу при дії мутагена-провокатора культуру інкубували протягом 53-х годин. На відміну від іонізуючого опромінення, діматіф індукує аберації переважно хроматидного типу, що дозволяє розрізняти мутагенний вплив обох мутагенних факторів [7].

Крім того, на прикладі реконвалесцентів, в якості мутагена-провокатора використали гамма-радіацію від джерела ¹³⁷Cs у дозі 50 сГр (на установці “Ігур”, при потужності дози 100 сГр за хвилину) за годину до початку культивування (на пресинтетичній G₀ стадії клітинного циклу), при температурі 37°C.

Препарати фарбували барвником Гімза рутинним методом. Цитогенетичний аналіз проводили з груповим каріотипуванням рівномірно забарвлених метафазних хромосом на зашифрованих препаратах. У кожному випадку досліджували не менш як 200 та 100 метафаз — без

додаткового мутагенного впливу та при обробці культур діматіфом і гамма-радіацією *in vitro*, відповідно.

Результати досліджень та їх обговорення. Фонова середньогрупова частота хромосомних порушень у осіб, які перехворіли на ГПХ, становила 3,9 на 100 клітин і вірогідно ($P < 0,01$) преревищила аналогічний показник у контрольній групі (1,4 на 100 клітин) (рис. 1).

Середньогрупова частота аберацій хромосом у осіб, які перехворіли на ГПХ, з додатковим навантаженням діматіфом *in vitro* становила 8,0 на 100 клітин (G_1), що була не набагато вище, ніж у контрольних культурах, оброблених діматіфом (7,1 на 100 клітин). Разом з тим, середньогрупова частота аберацій хромосом у осіб, які перехворіли на ГПХ, з додатковим навантаженням гамма-радіацією *in vitro* на G_0 стадії мітотичного циклу становила 15,5 на 100 клітин, що вірогідно вище, ніж у контрольних культурах, оброблених діматіфом (7,1 на 100 клітин) і відрізняється від фонові середньогрупової частоти хромосомних порушень (4,3 на 100 клітин) (рис. 1).

Середньогрупова частота аберацій хромосом у осіб, які перехворіли на ГПХ з додатковим навантаженням діматіфом і гамма-радіацією становила 10,1 на 100 клітин, що вірогідно вище, ніж в контрольних культурах, оброблених лише діматіфом (7,1 на 100 клітин), але вірогідно нижче, ніж в осіб, які перехворіли на ГПХ з додатковим навантаженням лише гамма-радіацією (15,5 на 100 метафаз).

Додаток до фонові рівня хромосомних аберацій (так званий надспонтанний рівень) у осіб, які перехворіли на ГПХ з додаванням діматіфу становив 4,1, з додаванням гамма-радіації — 11,6, з додаванням обох мутагенів — 6,2, а в осіб з контрольної групи — 5,6 на 100 метафаз, тобто в цілому експонована група виявилась більш чутливою до дії мутагенів-провокаторів.

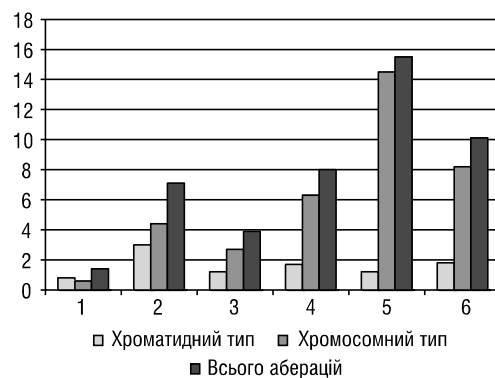


Рис. 1. Частота аберацій хромосом у реконвалесцентів ГПХ, в інтактних культурах і в культурах з тестуючим мутагенним навантаженням *in vitro* (Д — діматіф, Р — радіація): 1 — контроль; 2 — контроль + Д; 3 — ГПХ; 4 — ГПХ + Д; 5 — ГПХ + Р; 6 — ГПХ + Р + Д

Отримані дані свідчать про підвищену чутливість лімфоцитів до тестуючої дії мутагенів, що дозволило виявити приховану хромосомну нестабільність в лімфоцитах реконвалесцентів ГПХ.

За середньогруповою сумарною частотою стабільних (аномальні моноцентрики) та нестабільних (дицентрики і центричні кільця) маркерів група осіб, що перехворіла на ГПХ, виявилась більш радіочутливою при дії діматифу (0,4 і 2,0 на 100 клітин відповідно) і гамма-радіації (2,0 і 2,1 на 100 метафаз відповідно) ніж контрольна при дії діматифу (0,2 і 0,7 на 100 клітин відповідно), що може свідчити про дестабілізацію хромосомного апарату лімфоцитів у цій групі в результаті попередньої дії іонізуючого випромінювання *in vivo*. (рис. 2).

В обстежених групах спостерігали широкий розмах частот індивідуальних цитогенетичних показників — як фонових так і індукованих мутагенами-провокаторами, (які не корелювали поміж собою), що може бути зумовлено не лише особливостями генотипу, але й попереднім радіаційним впливом, який модифікував генетично детерміновану індивідуальну чутливість до мутагенного впливу.

Висновок. В результаті цитогенетичного обстеження групи реконвалесцентів ГПХ, постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії,

встановлено персистентність радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту у віддалений строк після опромінення. Показано можливість виявлення прихованої хромосомної нестабільності у опромінених осіб за допомогою тестуючої обробки культури лімфоцитів мутагенами-провокаторами діматифом і гамма-радіацією *in vitro*. Отримані результати підтвердили довгострокову дестабілізацію хромосомного апарату соматичних клітин людини внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.

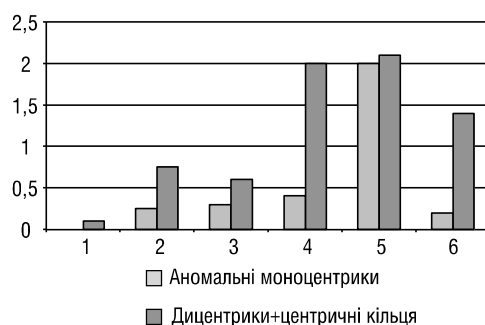


Рис. 2. Частота стабільних (аномальні моноцентрики) та нестабільних (дицентрики + центричні кільця) маркерів радіаційного впливу в обстежених групах з мутагенним навантаженням *in vitro* (Д — діматиф, Р — радіація): 1 — контроль; 2 — контроль + Д; 3 — ГПХ; 4 — ГПХ + Д; 5 — ГПХ + Р; 6 — ГПХ + Р + Д

ЛІТЕРАТУРА

1. Цитогенетичні ефекти в соматичних клітинах осіб з критичних чорнобильських контингентів у найближчі та віддалені строки після опромінення [Текст] / М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. В. Шеметун, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан, О. О. Талан // IV з'їзд медичних генетиків України: тези доп. — Львів, 2008. — С. 74.
2. Дёмина, Э. А. Радиационная цитогенетика. Русско-английский словарь-справочник [Текст] / М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин // К.: Здоров'я, 2009. — 367 с.
3. Цитогенетичний спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою теста "G₂-bleomycin sensitivity assay" [Текст]: методичні рекомендації / М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан; ДУ "НЦРМ АМН України". — К., 2008. — 25 с.
4. Радіаційно-індукована модифікація чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro* [Текст] / М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан // Цитология и генетика. — 2010. — Т. 44, № 2. — С. 58–64.
5. Цитогенетический эффект в соматических клетках лиц, подвергшихся радиационному воздействию в связи с аварией на ЧАЭС [Текст] / М. А. Пилинская, А. М. Шеметун, А. Ю. Бондарь, С. С. Дибский // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 8. — С. 40–43.
6. Педан, Л. Р. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* [Текст] / Л. Р. Педан, М. А. Пілінська // Доп. НАН України. — 2004. — № 12. — С. 175–179.
7. Педан, Л. Р. Радіоіндукований цитогенетичний ефект і його модифікація *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові осіб, які постраждали від дії факторів Чорнобильської аварії [Текст]: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15 / Педан Людмила Ростиславівна. — К., 2005. — 123 с.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОМОСОМНОЙ
НЕСТАБИЛЬНОСТИ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ
РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ
СОВМЕСТНОМ И РАЗДЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ МУТАГЕНОВ
РАДИАЦИОННОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ**

Л. Р. Педан

ГУ "Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины", г. Киев

Для выявления скрытой хромосомной нестабильности с помощью мутагенов-протокаторов диматифа и гамма-радиации проведено добровольное цитогенетическое обследование реконвалесцентов ОЛБ, облучённых вследствие Чернобыльской аварии. Полученные данные подтвердили не только длительную персистентность радиационно-индуцированного цитогенетического эффекта, но и реальность модификации генетически обусловленной чувствительности хромосом соматических клеток человека к тестирующей мутагенной нагрузке вследствие действия высоких доз ионизирующего излучения.

Ключевые слова: хромосомная нестабильность, острая лучевая болезнь, мутагены.

**REVEALING OF CHROMOSOME INSTABILITY WITH COMBINED
AND DISCRETE EFFECT OF MUTAGENES OF RADIATION
AND CHEMICAL NATURE IN SOMATIC CELLS OF PERSONS
RECOVERED FROM ACUTE RADIATION SYNDROME**

L. R. Pedan

*SI "National Research Centre for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Science of Ukraine", Kyiv*

For the revealing of hidden chromosome instability with the help of mutagen-provocateurs dimatyph and gamma-radiation the voluntary observation of persons recovered from acute radiation syndrome had been fulfilled. The data received confirmed not only the long-term persistence of radio-induced cytogenetic effect, but also reality of modification by high doses of ionizing radiation the inherited susceptibility of human somatic cells chromosomes to testing mutagenic exposure.

Key words: *chromosome instability, acute radiation syndrome, mutagenes.*