

Е.А. Дьоміна
В.М. Михайленко

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: радіогенний рак,
радіологи, периферична кров,
індивідуальна радіочутливість,
хромосомні G_0 - та G_2 -тести,
апоптоз, SH-групи плазми
крові.

ОБҐРУНТУВАННЯ ПРОФІЛАКТИКИ РАДІОГЕННОГО РАКУ У ПРОФЕСІОНАЛІВ, ЩО ПРАЦЮЮТЬ У СФЕРІ ДІЇ ІОНІЗУЮЧИХ ВИПРОМІНЮВАНЬ, ІЗ ЗАЛУЧЕННЯМ БІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

Мета: радіобіологічне обґрунтування первинної профілактики виникнення раку радіаційного генезу у професіоналів (радіологів) із залученням генетичних, біохімічного та клітинного методів. **Об'єкт і методи:** зразки периферичної крові 62 радіологів (117 спостережень) із різним стажем роботи у сфері дії радіації. **Тест-система** культури лімфоцитів крові з метафазним аналізом аберацій хромосом. Для визначення індивідуальної радіочутливості використовували хромосомні G_0 - та G_2 -тести. Апоптоз клітин визначали методом проточної цитометрії. Оцінку вмісту SH-груп у плазмі крові проводили спектрофотометричним методом. **Результати:** порівняльний аналіз індивідуальної радіочутливості (ІРЧ) хромосом лімфоцитів крові обстежених радіологів показав, що її специфічними показниками є частота хроматидних делецій. Її варіабельність залежить від стажу роботи у сфері дії радіації. Групу підвищеного професійного канцерогенного ризику становили переважно ветерани галузі. У більшості випадків не виявлено кореляції між індивідуальними значеннями спонтанного рівня аберацій хромосом (G_0 -тест) та ІРЧ хромосом (G_2 -тест). У радіологів з високою ІРЧ спостерігалось пригнічення мітотичного потенціалу клітин до $25,0 \pm 1,8\%$. При цьому між індивідуальною варіабельністю цього показника не виявлено. **Висновки:** аналіз результатів цитогенетичного обстеження професіоналів, що працюють у сфері дії радіації, дозволяє резюмувати: у випадках, коли підвищений спонтанний рівень хромосомних перебудов у лімфоцитах крові збігається з високою ІРЧ, слід очікувати найвищого ризику виникнення радіогенних пухлин. Зниження рівня сульфгідрильних груп білків і пептидів у плазмі крові є свідченням порушень метаболізму та окисно-відновної рівноваги і буде слугувати додатковим об'єктивним біомаркером для оцінки професійного ризику розвитку радіаційно-асоційованого раку.

Підвищення рівня онкологічної захворюваності в Україні значною мірою пов'язане зі збільшенням екологічного, в тому числі радіаційного, навантаження на населення [1]. ВООЗ визначила XXI століття як століття превентивної медицини та індивідуалізації захисту здоров'я людини. Відповідно до канонів доказової медицини первинна профілактика (ПП) спрямована на запобігання виникненню злоякісних пухлин як за рахунок усунення причин, так і мінімізації канцерогенної дії деяких чинників довкілля, зокрема іонізуючих випромінювань (ІВ) (рис. 1). Тому світові тенденції у профілактиці раку, в тому числі радіаційного генезу, за останній час змістилися та зосередилися на ПП.

За останні 20 років відмічається інтенсивне зростання кількості медичних радіологічних процедур, які на сьогодні є головним джерелом дії ІВ на людину [2]. Відповідно збільшується і чисельність пер-

соналу, задіяного у їх виконанні. Це зобов'язує дослідників, лікарів та організаторів охорони здоров'я населення країни зайняти чітку позицію щодо ПП розвитку онкологічних захворювань радіаційного генезу. Наразі вона проводиться не повною мірою, а існуючі окремі етапи її реалізації характеризуються фрагментарністю, відсутністю наукової бази та недосконалістю реєстрації онкологічних захворювань професійного генезу. Головна проблема полягає у відсутності контролю за індивідуальною радіочутливістю (ІРЧ) професіоналів, діяльність яких пов'язана із використанням джерел ІВ, в першу чергу променевих діагностів, радіаційних онкологів, а також персоналу атомних підприємств. Усе це зумовлює несвоєчасне забезпечення профілактичних заходів, наслідком чого є відсутність цілісного уявлення про шляхи запобігання розвитку радіогенного раку та недосконалість організації його ПП.



Рис. 1. Рівні профілактики захворювань

Згідно з сучасними уявленнями, ініційовані радіацією сублетальні та потенційно летальні пошкодження можуть зберігатися у клітинах тривалий час аж до наступної дії промотора. Отже, накопичення хромосомних мутацій у клітинній популяції вважається потенційно онкогенним, а малі (надфонові) дози іонізуючої радіації (ІР) визнані канцерогенно небезпечними [3, 4]. Суттєва відмінність дії ІР від інших канцерогенів полягає у тривалості формування кінцевих індукованих ефектів.

Зазначимо, що завдяки впровадженню в практику цифрових технологій рентгенодіагностики променеве навантаження на персонал останнім часом має виражену тенденцію до зниження. При цьому проблема професійного раку без перебільшення є складною саме серед професійних захворювань, що зумовлено мультифакторним характером його етіології. Тому розробці способів оцінки радіаційних ризиків у осіб, зайнятих у сфері дії ІВ, приділяється все більше уваги. Вихід із ситуації, що склалася, а також з урахуванням хронічної дії радіаційного фактора Чорнобильської катастрофи ми вбачаємо у персоналізації ПП раку, заснованої на визначенні ІРЧ; контролі застосування медичних препаратів із мутагенною активністю, які можуть потенціювати ефекти надфонових доз ІВ, та призначенні нетоксичних ефективних радіопротекторів професіоналам із високорадіочутливим генотипом. Важливим висновком раніше нами виконаних цитогенетичних досліджень є доказ вирішальної ролі інтенсивності процесів репарації у формуванні ІРЧ людини до опромінення в широкому діапазоні доз [5]. Сьогодні ми вважаємо, що для об'єктивної оцінки ІРЧ з метою виявлення гіперчутливих до дії ІВ осіб, у першу чергу тих, які працюють у сфері дії ІВ, використання тільки хромосомних тестів недостатньо. Необхідно визначити та надати радіобіологічне обґрунтування комплексу біомаркерів, що відображають не лише генетичні, але й метаболічні порушення, які можуть створювати передумови для підвищення генетично детермінованої ІРЧ та передують виникненню радіаційного канцерогенезу. Такий сценарій вирішення проблеми ПП радіаційно-асо-

ційованого раку є актуальним, оскільки має сприяти зниженню канцерогенного ризику, передусім серед осіб репродуктивного віку, зайнятих у сфері дії ІВ.

Мета дослідження: радіобіологічне обґрунтування ПП виникнення раку радіаційного генезу у професіоналів (радіологів) із залученням генетичних, біохімічного та клітинного методів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Співробітники Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України протягом багатьох років займаються біоіндикацією променевих уражень із використанням тест-системи культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) людини і метафазним аналізом радіаційно-індукованих перебудов хромосом.

Обґрунтування використання тест-системи культури ЛПК відповідно до мети дослідження. ЛПК людини — унікальний за своїми властивостями об'єкт для проведення радіаційно-генетичних досліджень, оскільки є найчутливішим і специфічним показником променевої дії та рекомендований весвітніми міжнародними організаціями (ВООЗ, МАГАТЕ, НКДАР ООН) для виконання медико-біологічної індикації ступеня променевого ураження [6, 7]. Згідно із загальноприйнятою класифікацією, ЛПК належать до першого класу — вегетативних інтермітентних, тобто найбільш радіочутливих, клітин організму людини. Це дозволяє реєструвати достовірне підвищення радіаційно-індукованого рівня аберацій хромосом над спонтанним (середньопопуляційним) навіть при малих дозах опромінення. У радіаційній цитогенетиці прийнято положення, що середньопопуляційний рівень спонтанних аберацій хромосом у ЛПК здорових осіб становить 3%. У зазначеній тест-системі ЛПК досліджують хромосоми головних функціональних клітин імунної системи, а саме Т-лімфоцитів, відповідальних за протипухлинний захист організму. Встановлено приблизно однаковий вихід хромосомних аберацій при опроміненні лімфоцитів в умовах *in vitro* та *in vivo*. Це означає, що на опромінення лімфоцит реагує як автономна біологічна система. Висока мобільність лім-

фоцитів у кров'яному руслі, розподіл лімфатичних вузлів по всьому організму, їх здатність акумулювати перебудови хромосом дозволяють оцінювати радіочутливість організму людини в цілому. У периферичній крові лімфоцити не діляться, перебуваючи в стадії спокою (G_0), і являють собою синхронізовану популяцію клітин. Встановлено, що серед них максимум лише 0,3% здійснюють синтез ДНК. Під впливом мітогену починається трансформація більшості лімфоцитів, що забезпечує їх проліферацію.

Сьогодні існує два головні хромосомні тести для визначення ІРЧ людини з використанням культури ЛПК та метафазним аналізом аберацій хромосом. Перший — це оцінка спонтанного рівня аберацій хромосом в ЛПК (G_0 -тест), який є інтегральним показником дії на людину канцерогенних чинників не тільки променевої, а й хімічної природи, і тому недостатньо специфічний для оцінки ІРЧ. Другий — оцінка цитогенетичного ефекту в ЛПК, індукованого тестуючим опроміненням в найбільш радіочутливій G_2 -стадії клітинного циклу (G_2 -тест). Залежність виходу аберацій хромосом у ЛПК при одній дозі опромінення у різних осіб розрізняється, що дає підстави розглядати кількісні цитогенетичні дані як об'єктивні показники ІРЧ людини.

У дослідженнях ми використовували цілну венозну кров 62 радіологів (117 спостережень) із різним стажем роботи у сфері дії ІВ. Вони обіймали посади лікаря, рентгенолаборанта, рентгенотехніка у відділеннях променевої діагностики та терапії лікувально-профілактичних закладів. Вивчено індивідуальні дані щодо їх віку, посади, трудового стажу, анамнезу із переліком супутніх захворювань, спадкової онкологічної обтяженості. При цьому керувалися положенням Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (2008), яка передбачає інформовану згоду донорів на участь у дослідженні, а також загальними етичними принципами, прийнятими на Першому національному конгресі України з біоетики (2001).

Культивування клітин здійснювали відповідно до стандартного протоколу [8] протягом 52 год при 37 °С. До складу культуральної суміші входили: живильне середовище RRM1 1640 («Gibco», США), ембріональна бичача сироватка, гентаміцину сульфат (4% розчин), мітоген Т-лімфоцитів фітогем-аглютинін (ФГА; «Gibco», США). Для накопичення метафазних пластинок хромосом використовували колцемід («Sigma», США).

Цитогенетичний аналіз. Відбір метафазних пластинок здійснювали за загальноприйнятими вимогами. Метафазна пластинка має містити 46 ± 1 хромосому. Усі хромосоми повинні бути чітко пофарбовані і рівномірно розподілені у метафазній пластинці (рис. 2). На одне спостереження аналізували в середньому 200–300 метафаз. Для оцінки загальної радіочутливості хромосом (G_0 -тест) визначали частоту абераційних клітин (%), загальну частоту аберацій хромосом, частоту аберацій хроматидного та хро-

мосомного типів, частоту окремих видів аберацій на кожні 100 проаналізованих метафаз.

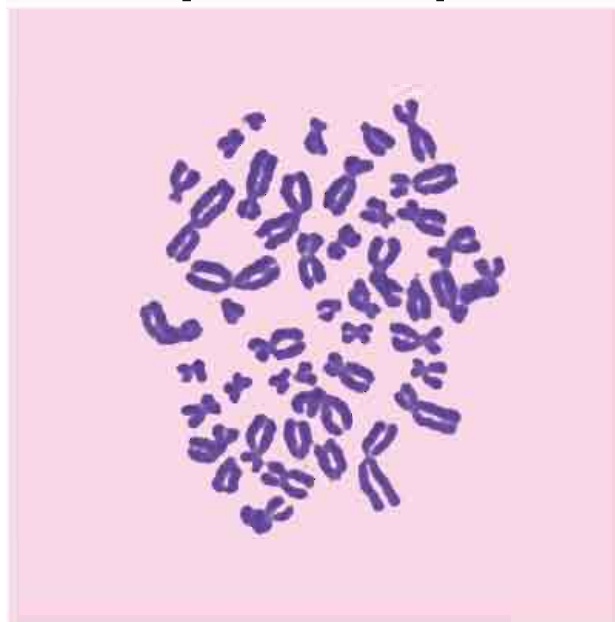


Рис. 2. Метафазна пластинка лімфоцита крові людини

На відміну від методичного підходу, що зазвичай використовується для визначення ІРЧ хворих онкологічного профілю [9–11], ми пропонуємо виконувати метафазний аналіз у період, коли більшість лімфоцитів діляться у культурі уперше, оскільки у наступних мітозах частота аберацій знижується за рахунок елімінації абераційних клітин, їх репродуктивної загибелі, радіаційної затримки мітозів, а можливо, і змін просторового розташування хромосомних перебудов. Крім того, швидкість проходження мітотичних циклів лімфоцитів у культурі суттєво залежить від індивідуальної імунореактивності людини.

Оцінка ІРЧ. Відповідно до розробленого нами алгоритму [12] при визначенні ІРЧ доцільно виконувати такі етапи:

- тестуюче опромінення культури ЛПК здійснювали на 46-й годині інкубації клітин, тобто в кінці G_2 -періоду, оскільки в цей термін спостерігається найбільш повне виявлення розбіжностей ІРЧ хромосом;
- для тестуючого опромінення використовували джерела рідкоіонізуючих випромінювань (рентгенівські, або гамма-промені); доза опромінення становила 1,5 Гр, що дозволяє реєструвати індивідуальні розбіжності чутливості каріотипу обстежених осіб до опромінення;
- метафазний аналіз препаратів виконували в першому післяпроменевому мітозі; для визначення ІРЧ застосовували «провокаційне» опромінення культури клітин у G_2 -стадії, для спектра аберацій якої притаманні аберації хроматидного типу.

Дослідження мітотичної активності лімфоцитів крові. Здатність Т-лімфоцитів до ФГА-стимульованої бласттрансформації є критерієм функціональної активності імункомпетентних клі-

тин людини. В якості показника проліферативної активності клітин використовували значення мітотичного індексу (МІ) лімфоцитів за таких умов:

- із аналізу виключали ядра поліморфноядерних клітин, нестимульовані ФГА або мертві клітини;
- підраховували кількість клітин в стадії метафази (M_1);
- підраховували кількість стимульованих (бластних) клітин (M_2).

МІ визначали в проміле за формулою 1:

$$MI = M_1/M_2 \cdot 1000, \% \quad (1)$$

Виділення плазми та ЛПК. Зразки крові до їх використання для отримання плазми. Периферичну кров збирали в стерильну ємність з антикоагулянтом (гепарином — 0,01%) та зберігали при 3–5 °С до отримання плазми і лімфоцитів. Плазму крові отримували центрифугуванням протягом 15 хв при 3000 об./хв та кімнатній температурі. Виділення ЛПК виконували на Ficoll-Paque PLUS згідно з інструкцією виробника (GE Healthcare BioSciences AB). Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім.

Дослідження апоптозу. Вміст гіподиплоїдних клітин у зразках ЛПК, що зазнавали або не зазнавали опромінення, визначали методом проточної цитометрії з фарбуванням у розчині пропідію йодиду («Sigma», США) [13]. Флуоресценцію клітин оцінювали на проточному цитофлуориметрі FACScan («Becton Dickinson», США). У кожній пробі підраховували не менш ніж 10 тис. клітин. Мертві клітини та їх фрагменти вилучали з кінцевого аналізу. Для кількісного аналізу даних застосовували програму CELLQuest («BD Biosciences Pharmingen», США).

Дослідження рівня SH-груп у плазмі крові. Оцінку вмісту сульфгідрильних груп білків і пептидів (СГБ) в плазмі крові проводили спектрофотометричним методом за реакцією із 5,5-дитіобіс(2-нітробензоатом) (ДТНБ) [14]. Вміст СГБ виражали в мкМ забарвленого аніона 2-нітро-5-тіобензоату на 1 мг білка і обчислювали з урахуванням молярного коефіцієнта екстинції ($\epsilon = 1,86 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) за формулою 2:

$$c = (1,86 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} / \epsilon / V_{\text{плазми}} \cdot Cb) \cdot 10^6, \quad (2)$$

де ϵ — поглинання при 412 нм; V — об'єм плазми, мл; Cb — концентрація білка, мг/мл; 10^6 — коефіцієнт перерахунку у мкМ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичні дослідження радіочутливості лімфоцитів крові професіоналів, що працюють у сфері дії ІР. Одержані результати представлено окремо для першої групи обстеження радіологів, стаж роботи яких у сфері дії ІВ не перевищує 1,5 року, та другої — стаж роботи яких становить понад 1,5 року.

На рис. 3 наведено дані цитогенетичного обстеження професіоналів першої групи. Середньогру-

пова частота спонтанних аберацій хромосом у ЛПК осіб цієї групи за хромосомним G_0 -тестом становила $3,8 \pm 0,3$ аберації/100 метафаз (від 1 до 13 аберацій/100 метафаз). Це незначно перевищує величину середньопопуляційного показника (3 аберації/100 метафаз), який є стандартом для оцінки спонтанного та індукованого рівня генетичних пошкоджень у радіаційній цитогенетиці. Але у 40% випадків індивідуальна частота аберацій хромосом у лімфоцитах обстежених радіологів у 1,5–2,0 раза перевищувала значення середньопопуляційного показника. У спектрі хромосомних перебудов переважають аберації хроматидного типу, в основному делеції, а у трьох випадках спостерігали стабільні аберації хромосомного типу — транслокації (аномальні хромосоми), які вважаються променевими маркерами. Підвищений рівень аберацій хроматидного типу свідчить про нестабільність геному обстежених осіб. Виходячи із парадигм радіаційного канцерогенезу, додаткове професійне опромінення цих осіб буде ускладнювати нестабільність їх геному і потенційно сприяти підвищенню канцерогенного ризику. Таке тлумачення підтверджується далі даними цитогенетичного обстеження радіологів другої групи (рис. 4).

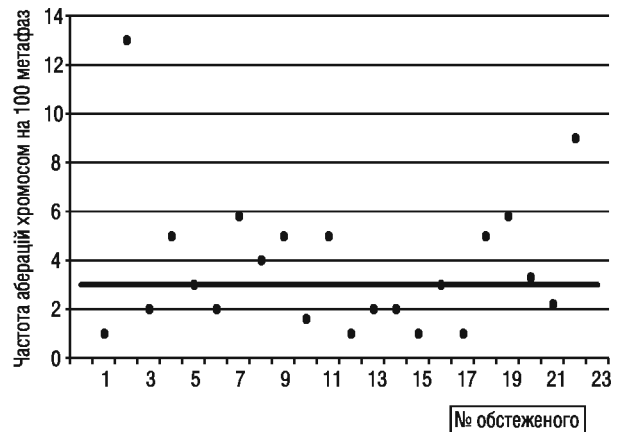


Рис. 3. Загальна радіочутливість лімфоцитів крові професіоналів першої групи (хромосомний G_0 -тест)

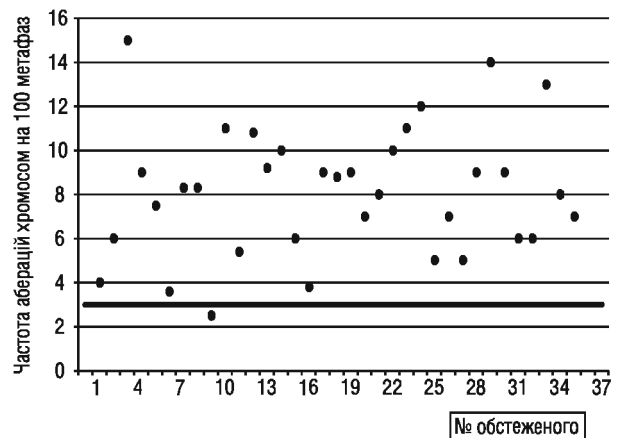


Рис. 4. Загальна радіочутливість лімфоцитів крові професіоналів другої групи (хромосомний G_0 -тест)

У рамках виконаного дослідження показано, що, на відміну від першої групи, при цитогене-

тичному обстеженні радіологів із більшим стажем роботи середньогрупова частота спонтанних аберацій за хромосомним G_0 -тестом становила вже $8,3 \pm 0,6/100$ метафаз. Значення дослідженого показника більше ніж у 2 рази перевищує величину середньопопуляційного, а також спонтанних аберацій, визначених для радіологів першої групи. Встановлено, що приблизно в 90% випадків реєструється індивідуальний підвищений рівень аберацій хромосом. У 38% обстежених осіб у спектрі генетичних пошкоджень відмічали променеві маркери (дицентричні та аномальні хромосоми) від 0,5 до 6,0/100 метафаз, що свідчить про радіаційну навантаженість геному обстежених професіоналів (рис. 5, 6).

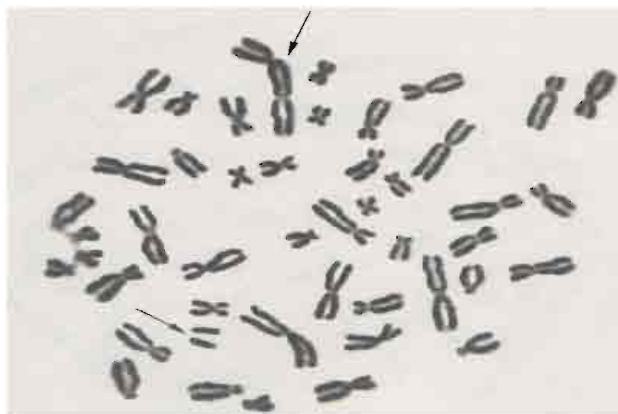


Рис. 5. Дицентрична хромосома та супроводжувальний парний фрагмент

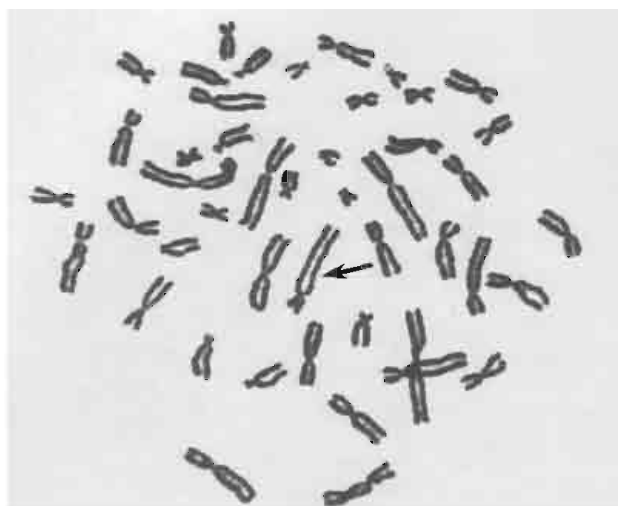


Рис. 6. Транслокація (аномальна хромосома)

На рис. 7 та 8 наведено цитогенетичні дані індивідуальної радіаційної чутливості лімфоцитів крові радіологів із різним стажем роботи у сфері дії ІВ. Ці дані одержано із використанням хромосомного G_2 -тесту, ключовим етапом якого є «провокативне» опромінення культури клітин у пізній G_2 -період мітотичного циклу.

Діапазон варіабельності значень загальної кількості радіаційно-індукованих структурних перебудов хромосом (за G_2 -тестом) в лімфоцитах крові професіоналів першої групи обстеження становив від 19 до 67 аберацій/100 метафаз (див. рис. 7). Серед них

у близько 50% спостережень реєструються індуковані аберації у межах від 25 до 40 хромосомних перебудов на кожні 100 проаналізованих клітин. Аналіз спектра радіаційно-індукованих перебудов показав, що істотний внесок у формування генетичної нестабільності роблять аберації хроматидного типу, а саме делеції. Частота хроматидних розривів, які представлені у вигляді делецій у метафазних клітинах при тестуванню опроміненні у G_2 -період мітотичного циклу, відображає рівень нерепарованих подвійних розривів молекул ДНК, а індивідуальні розбіжності в радіочутливості хромосом формуються за рахунок генетично-контрольованої роботи системи репарації радіаційно-індукованих пошкоджень [15].

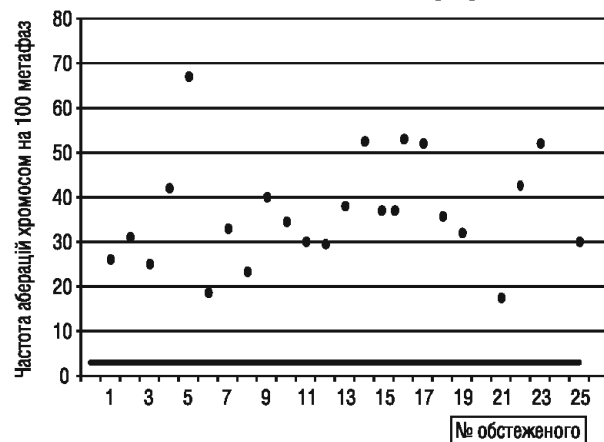


Рис. 7. ІРЧ лімфоцитів крові професіоналів першої групи (хромосомний G_2 -тест)

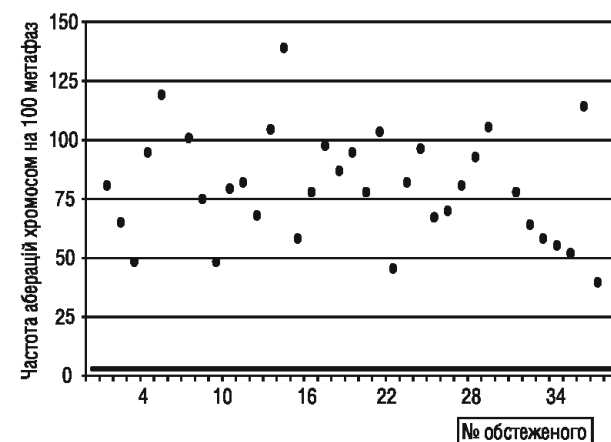


Рис. 8. ІРЧ лімфоцитів крові професіоналів зі стажем роботи у сфері дії ІВ понад 1,5 року (хромосомний G_2 -тест)

На відміну від цитогенетичних даних, одержаних при обстеженні професіоналів першої групи, у фахівців другої групи із більшим стажем роботи у сфері дії ІВ діапазон варіабельності значень загальної частоти хромосомних перебудов становив від 45 до 140 аберацій/100 метафаз (див. рис. 8). Майже у 90% спостережень реєструються радіаційно-індуковані аберації у межах від 50 до 100 перебудов на кожні 100 проаналізованих клітин. Поряд із реєстрацією хроматидних делецій особливістю спектра індукованих генетичних змін у лімфоцитах крові представників цієї групи є формування обмінів як хроматидного, так і хромо-

сомного типів. Це суттєво ускладнює нестабільність геному обстежених осіб та потенційно підвищує ризик виникнення радіаційно-асоційованого раку.

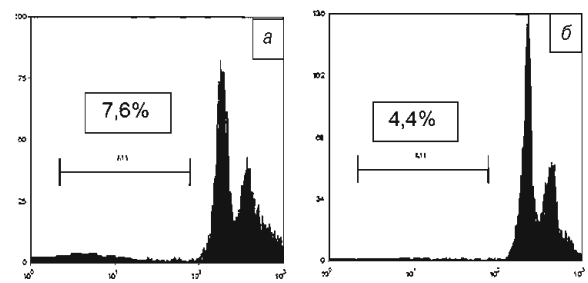
Таким чином, порівняльний аналіз ІРЧ хромосом лімфоцитів крові обстежених радіологів показав, що специфічними показниками ІРЧ є частота хроматидних делецій, а її варіабельність залежить від стажу роботи у сфері дії ІВ. Групу підвищеного професійного радіаційного ризику формували переважно ветерани галузі. У рамках виконаного дослідження встановлено, що у більшості випадків не виявлено кореляції між індивідуальними значеннями спонтанного рівня аберацій хромосом (G_0 -тест) та ІРЧ хромосом (G_2 -тест); коефіцієнт кореляції становив 0,1 при $r = 0,05$.

Зазвичай цитогенетична оцінка ІРЧ людини здійснювалася на основі аналізу спонтанного рівня аберацій хромосом та пошуку в його спектрі променевих маркерів (хромосомний G_0 -тест). Як зазначено вище, такий метод оцінки ІРЧ, без сумніву, є менш інформативним, оскільки спонтанний рівень аберацій хромосом є інтегральним показником дії на організм різноманітних мутагенних та канцерогенних чинників довкілля. На відміну від нього, хромосомний G_2 -тест оцінює генетично детерміновану чутливість індивідуума саме до радіаційного чинника, яку фактори довкілля при певних обставинах можуть модифікувати [12]. Однак на основі одержаних результатів вважаємо, що у тих випадках, коли підвищений спонтанний рівень хромосомних перебудов збігається з високою ІРЧ, слід очікувати найвищого ризику виникнення радіогенних пухлин.

Раніше нами встановлено, що в контрольній групі умовно здорових осіб (УЗО) МІ лімфоцитів становить $63,7 \pm 3,2\%$ [12]. У цьому дослідженні у радіологів з високою ІРЧ також спостерігалася пригнічення мітотичного потенціалу клітин до $25,0 \pm 1,8\%$. При цьому міжіндивідуальної варіабельності цього показника не виявлено.

Визначення кількості апоптотичних клітин в ЛПК. У ЛПК радіологів визначали рівень спонтанного або індукованого рентгенівським опроміненням в дозі 2 Гр апоптозу клітин, який оцінювали за відсотком гіподиплоїдних клітин, використовуючи стандартний метод проточної цитометрії після фарбування ДНК клітин пропідію йодидом. Отримані результати порівнювали із групою УЗО — донорів. Репрезентативні гістограми розподілу інтенсивності флуоресценції ЛПК у цих групах наведено на рис. 9. Результати визначення відсотка гіподиплоїдних клітин за даними цитометрії в ЛПК радіологів та УЗО наведено на рис. 10. Середні значення вмісту апоптотичних клітин в популяції ЛПК суттєво відрізнялися між дослідженими групами. Так, відсоток гіподиплоїдних клітин у групі УЗО суттєво перевищував (у 1,72 раза) їх значення у групі радіологів, що може свідчити про посилення елімінації пошкоджених клітин у осіб, які професійно зазнають постійного впливу ІВ. Відмінність між дослідженими групами також проявилася у різній чутливості ізольо-

ваних ЛПК до тестуючого опромінення крові *in vitro* в дозі 2 Гр. У групі радіологів опромінення ЛПК призводило до збільшення (в 1,34 раза) кількості клітин в стані апоптозу, на відміну від групи УЗО, де опромінення не викликало збільшення відсотка гіподиплоїдних клітин. Аналіз статистичних показників вмісту апоптотичних клітин в ЛПК досліджених груп свідчить про значні відмінності в їх чутливості до ІВ. Так, порівняльний аналіз дисперсії, яка є мірою відхилення значень випадкової величини від середнього значення розподілу, показав, що дисперсія в групах УЗО та радіологів без тестуючого опромінення мало відрізнялася між групами (в 1,15 раза). При опроміненні дисперсія значень досліджуваного показника достовірно збільшувалася в 2,73 раза в групі УЗО та 3,7 раза в групі радіологів. При цьому коефіцієнт варіації в обох групах збільшувався на 61–70% при опроміненні ЛПК *in vitro*, що вказує на значну мінливість цього показника.



РІ₃

Рис. 9. Гістограми розподілу інтенсивності флуоресценції ЛПК, помічених пропідію йодидом: а — інтактні ЛПК групи УЗО; б — інтактні ЛПК групи радіологів. Зазначено відсоток гіподиплоїдних клітин за кількістю ДНК на клітину в діапазоні, виділеному як М1

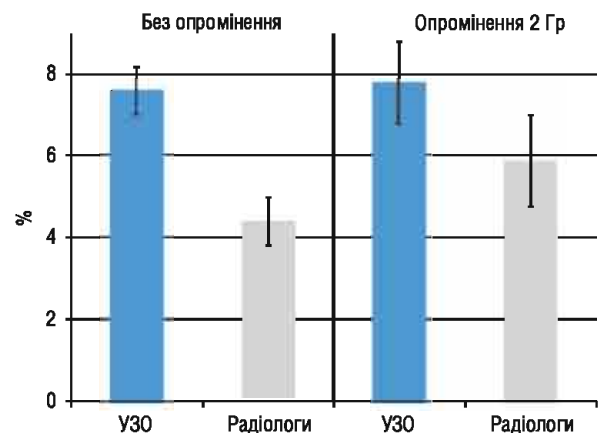


Рис. 10. Рівень спонтанного або індукованого тестуючим рентгенівським опроміненням в дозі 2 Гр апоптозу в ЛПК груп УЗО та радіологів

Таким чином, зареєстровано відмінності вмісту клітин в стані апоптозу в популяції ЛПК, виділених із крові донорів контрольної та дослідної груп. Відсоток гіподиплоїдних клітин у групі УЗО на 58% перевищував їх значення у групі радіологів, що може свідчити про посилення елімінації пошкоджених

клітин в осіб, які працюють у сфері впливу ІВ. Встановлено, що ЛПК дослідної та контрольної груп мають різну чутливість до тестуючого опромінення крові. Опромінення ЛПК призводило до збільшення на 35% кількості клітин в стані апоптозу, на відміну від групи УЗО, де опромінення не спричиняло підвищення відсотка гіподиплоїдних клітин. Отримані дані свідчать про активацію апоптотичного шляху елімінації радіаційно пошкоджених ЛПК у професіоналів, робота яких пов'язана із використанням джерел ІВ.

Визначення рівня СГБ. Науковий інтерес до дослідження вмісту СГБ у плазмі крові переважно пов'язаний з їх значенням у регуляції окисно-відновної рівноваги і метаболічних процесів. Це послужило основним критерієм при відборі цього показника як маркера для оцінки ІРЧ серед професіоналів, що працюють у сфері впливу ІВ, дія яких призводить до порушень окисно-відновної рівноваги в організмі.

Результати спектрофотометричного визначення рівня СГБ в плазмі крові у групах УЗО та радіологів наведено на рис. 11. Виявлено, що в плазмі крові осіб контрольної групи середнє значення вмісту СГБ становило $0,252 \pm 0,007$ мкМ. У групі донорів, які працюють у сфері дії ІВ, кількість SH-груп була достовірно зменшеною ($p \leq 0,05$) в 1,7 раза порівняно із їх значенням в крові групи УЗО і становила $0,146 \pm 0,006$ мкМ.

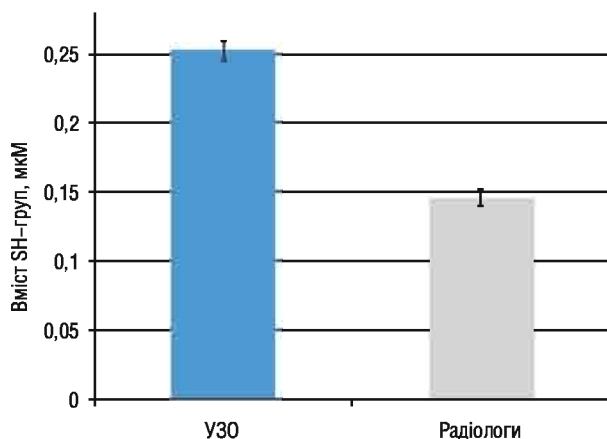


Рис. 11. Вміст SH-груп (мкМ) в плазмі крові УЗО та радіологів

Аналіз статистичних показників вмісту SH-груп в плазмі крові УЗО та радіологів свідчить про достовірні відмінності між ними. Порівняльний аналіз дисперсії в групах УЗО та радіологів не виявив значних відхилень між групами. Однак коефіцієнт варіації в групі радіологів збільшувався в 1,9 раза порівняно зі значенням в групі УЗО, що свідчить на значну мінливість цього показника в осіб, які працюють у сфері дії ІВ. З урахуванням важливості підтримання вмісту SH-груп в плазмі крові на певному рівні, зокрема для утримання окисно-відновної рівноваги в організмі, наявність значної варіабельності показника не тільки потребує подальшо-

го вивчення, а і вказує на необхідність враховувати рівень СГБ у плазмі крові при роботі в умовах підвищеного рівня ІВ.

Таким чином, встановлено достовірне зниження (на 60%) вмісту СГБ в плазмі крові осіб, які на робочому місці зазнають впливу ІВ, що є додатковим фактором професійного ризику в плані розвитку радіаційно-асоційованого раку. Даний показник може слугувати додатковим при формуванні груп підвищеного канцерогенного ризику серед професіоналів, діяльність яких пов'язана із використанням джерел ІВ.

ГОЛОВНІ ВИСНОВКИ ТА ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Аналіз результатів цитогенетичного обстеження професіоналів, що працюють у сфері дії радіації, дозволяє резюмувати: у випадках, коли підвищений спонтанний рівень хромосомних перебудов у лімфоцитах крові збігається з високою ІРЧ, слід очікувати найвищого ризику виникнення радіогенних пухлин. Зниження рівня СГБ у плазмі крові є свідченням порушень метаболізму та окисно-відновної рівноваги і буде слугувати додатковим об'єктивним біомаркером для оцінки професійного ризику розвитку радіаційно-асоційованого раку.

Таким чином, підвищена радіаційно-індукована дестабілізація геному соматичних клітин (хромосомні G_0 - і G_2 -тести) та зміни метаболізму і порушень окисно-відновної рівноваги (рівень SH-груп білків і пептидів в плазмі крові) є підставою для комплексного застосування цих тестів в якості прогностичних показників підвищеного ризику виникнення радіогенного раку та своєчасного вживання профілактичних засобів.

Робота проведена в рамках Державного замовлення МОН України, НДР (договір ДЗ/27–2017) «Радіобіологічне обґрунтування первинної індивідуальної профілактики радіаційно-асоційованого раку» (№ держреєстрації 0117U006899, 2017–2018 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. National Report of Ukraine: Twenty-five Years of the Chernobyl Disaster. Safety of the Future (Ministry of Emergencies of Ukraine, All-Ukraine Institute of Civil Protection of Population), 2011. Kyiv: KIM. 356 p.
2. OECD Health Data: Health care resources: OECD Health Statistics (database). DOI: 10.1787/ct-exams-tot table-2013-1-en.
3. Radford IR. Chromosomal rearrangements as the basis for human tumorigenesis. *Int J Radiat Biol* 2004; **80** (8): 543–57.
4. Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S. Impact of types of lymphocytes chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* 2004; **64** (6): 2258–63.
5. Domina EA, Ryabchenko NM, Barylyak IR. A study of the contribution of repair processes to the formation of individual radiosensitivity in human beings at the chromosome level. *Cytol Genet* 2008; **2** (2): 107–10.
6. Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Reports series № 260 1986; Vienna: Int Atom Energy Agency. 69 p.

7. United Nations. Ionizing Radiation. Sources and Biological effects. UNSCEAR 1982. Report to the General Assembly with annexes 1982; New York: United Nations publ. 82 p.

8. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies 2011; Vienna: IAEA. 232 p.

9. West CM, Barnett GC. Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: Towards prediction. *Genome Med* 2011; 3 (8): 52.

10. Borgmann K, Haerberle D, Doerk T, et al. Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G_0 and G_2 -phase human lymphocytes. *Radiother Oncol* 2007; 83 (20): 196–202.

11. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. *In vivo* versus *in vitro* individual radiosensitivity analyses in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2012; 38 (5): 405–13.

12. Domina EA. Radiogenic Cancer: Epidemiology and Primary Prevention. «Scientific Book» Project. Kyiv: Naukova Dumka, 2016. 196 p. (in Russian).

13. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 2006; 1 (3): 1458–61.

14. Verevkin IV, Tochilkin AI, Popova NA. Colorimetric method for determining of SH-groups and -S-S-bonds in proteins using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Modern methods in biochemistry. VN Orekhovich* (ed.). Moscow: Medicine, 1977. p. 223–31.

15. Smart V. Chromosomal radiosensitivity: a study of the chromosomal G_2 -assay in human blood lymphocytes indicating variability. *Mutat Res* 2003; 528: 105–10.

THE ARGUMENTATION OF THE PREVENTION OF RADIOGENIC CANCER IN PROFESSIONALS THAT WORK IN THE FIELD OF IONIZING RADIATION USING BIOLOGICAL METHODS

E.A. Domina, V.M. Mykhailenko

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine*

Summary. *Aim: radiobiological argumentation of primary prevention of cancer with radiation genesis in professionals (radiologists) with the use of genetic, biochemical and cellular methods. Object and methods: samples of peripheral blood of 62 radiologists (117 observations) with different work experience in the field of radiation. A test system of culture of blood lymphocytes*

with a metaphase analysis of chromosome aberrations. Chromosomal G_0 - and G_2 -tests were used to determine an individual radiosensitivity. Cell apoptosis was determined by using the method of flow cytometry. The evaluation of SH-groups level in blood plasma was performed by spectrophotometric method. Results: the comparative analysis of individual radiosensitivity (IR) of chromosomes in blood lymphocytes of examined radiologists has shown that its specific indicator is the frequency of chromatid deletions. Its variability depends on the length of work in the field of radiation. The group of increased occupational carcinogenic risk consisted mainly of veterans of the branch. In most cases, no correlation was found between the individual values of the spontaneous level of chromosomal aberrations (G_0 -test) and IR chromosomes (G_2 -test). The radiologists with a high IR level had a suppression of the mitotic potential of cells up to $25.0 \pm 1.8\%$. At the same time, the interindividual variability of this indicator was not revealed. Conclusions: an analysis of the results of the cytogenetic survey of professionals working in the field of radiation suggests that in the cases where the increased spontaneous level of chromosomal alterations in blood lymphocytes coincides with high IR, the greatest risk of developing radiogenic tumors should be expected. Decrease of sulfhydryl groups level in proteins and peptides of the blood plasma is evidence of metabolic and redox disturbances and will serve as an additional objective biomarker to assess the occupational risk of radiation-associated cancer.

Key Words: radiogenic cancer, radiologists, peripheral blood, individual radiosensitivity, chromosomal G_0 - and G_2 -tests, apoptosis, SH-groups in blood plasma.

Адреса для листування:

Дьоміна Е.А.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: edjomina@ukr.net

Одержано: 26.09.2018