УДК 576.312.32/38;612.014.482

© 2012

М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. І. Швайко, В. О. Сушко

Реалізація прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС, хворих на рак легенів

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

За допомогою модифікованого тесту "G_2-bleomycin sensitivity assay" визначено надфоновий цитогенетичний ефект, величина якого вважається маркером прихованої хромосомної нестабільності (ПХН), в учасників ліквідації наслідків Чорнобильської аварії, хворих на рак легенів. Виявлено істотні міжіндивідуальні коливання індукованого цитогенетичного ефекту та відсутність позитивної кореляції між фоновими та надфоновими частотами хромосомних аберацій, що обумовлено індивідуальною чутливістю до мутагенної дії блеоміцину. Зроблено припущення про існування асоціації між радіаційно-індукованим підвищенням генетично детермінованої індивідуальної чутливості до тестуючого мутагенного навантаження та реалізацією онкологічної патології у опромінених осіб. Підтверджено доцільність використання тесту "G_2-bleomycin sensitivity assay" при медичному обстеженні опромінених контингентів для визначення величини ПХН як одного з інформативних маркерів схильності до онкологічних захворювань.

Одним із проявів нестабільності геному в соматичних клітинах людини є прихована хромосомна нестабільність (ПХН), маркером якої вважається величина надспонтанного (надфонового) цитогенетичного ефекту, індукованого *in vitro* так званими мутагенами-провокаторами, найчастіше — радіоміметиком блеоміцином у тесті "G_2-bleomycin sensitivity assay" [1]. Ступінь вияву такого ефекту залежить від індивідуальної чутливості до тестуючого мутагенного навантаження, яка є генетично зумовленою ознакою [1].

У наших попередніх дослідженнях модифікований тест "G_2-bleomycin sensitivity assay" [2] було використано при цитогенетичному обстеженні умовно здорових осіб та учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС (УЛНА) з різними дозами опромінення [3], а також хворих на рак легенів (РЛ), які заперечували свідомий контакт зі знаними чи потенційними мутагенами [4]. Отримані результати підтвердили можливість радіаційно-індукованої модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином, що призводить до підвищення частоти зустрічальності осіб із ПХН, а також доцільність використання тесту "G_2-bleomycin sensitivity assay" для визначення ПХН як одного з маркерів схильності до онкологічних захворювань [4].

Для визначення можливої асоціації між радіаційно-індукованим підвищенням індивідуальної чутливості до тестуючої мутагенної дії блеоміцину та можливістю реалізації онкопатології наші подальші дослідження були спрямовані на цитогенетичні обстеження онкологічних хворих, які зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС. З цією метою нами були обстежені 15 УЛНА з діагнозом РЛ (верифікованим у відділенні пульмонології відділу терапії радіаційних наслідків Інституту клінічної радіології ННЦРМ НАМН Ук-

раїни) до використання радіо- чи хіміотерапії. Усі пацієнти — чоловічої статі, віком 45–82 роки, середній вік 58 років; з них 9 — курці тютюну; 6 — заперечували тютюнопаління. Офіційні дози опромінення в цій групі коливались від 24,2 до 180,4 мГр і становили в середньому 57,8 мГр.

У обстежених осіб визначали фонові (вихідні) частоти всього спектра хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові та індивідуальну чутливість до кластогенної дії блеоміцину *in vitro* за розробленим нами алгоритмом [2].

Умови культивування лімфоцитів, принципи проведення цитогенетичного аналізу, обчислення коефіцієнта ПХН ($K_{\text{ПХН}}$) для визначення індивідуальної чутливості до дії блеоміцину відповідали таким, що були наведені в наших попередніх публікаціях [3, 4]. Кількість проаналізованих клітин для кожної з обстежених осіб коливалась від 200 до 500 метафаз; усього проаналізували 16 900 метафаз.

У табл. 1 наведені середньогрупові фонові та індуковані блеоміцином *in vitro* (у концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл) частоти цитогенетичних показників у групі УЛНА з діагнозом РЛ. Для оцінки, аналізу та порівняння одержаних даних використовували результати цитогенетичного обстеження осіб з діагнозом РЛ, які заперечували свідомий контакт з радіаційним чинником, проведеного нами на попередніх етапах досліджень [4].

Згідно з одержаними даними (див. табл. 1), у групі УЛНА з діагнозом РЛ середньогрупові фонові частоти аберантних метафаз ($2{,}67 \pm 0{,}19\%$) та хромосомних аберацій ($2{,}96 \pm 0{,}20$ на 100 клітин) не перевищували верхньої межі середньопопуляційного рівня, який у $\sim$98% випадків знаходився в межах від 1,00 до 3,00% [5], та майже збігалися з відповідними значеннями цих показників у неопромінених осіб з РЛ — $2{,}51 \pm 0{,}20\%$ та $2{,}54 \pm 0{,}20$ на 100 клітин відповідно [4].

Серед пошкоджень хромосом домінували ацентрики — одиночні та вільні парні фрагменти із середньогруповими частотами $1{,}39 \pm 0{,}14$ та $0{,}95 \pm 0{,}12$ на 100 клітин відповідно, що знаходилось в межах середньопопуляційного рівня спонтанного хромосомного мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини [5] та достовірно не відрізнялось від аналогічних показників у групі осіб з РЛ, які заперечували свідомий контакт з іонізуючим випромінюванням ($1{,}58 \pm 0{,}16$ та $0{,}63 \pm 0{,}10$ на 100 клітин відповідно) [4].

Разом з тим середньогрупова фонова частота суми нестабільних маркерів радіаційної дії (дицентрики + центричні кільця) у УЛНА з РЛ становила $0{,}35 \pm 0{,}05$ на 100 метафаз, що вірогідно ($p < 0{,}05$) перевищувало таку як у групі онкологічних хворих без радіаційного впливу ($0{,}11 \pm 0{,}04$ на 100 метафаз), так і в популяційному контролі ($0{,}08 \pm 0{,}03$ на 100 клітин) [4, 5]. Водночас, частота стабільних маркерів радіаційної дії (атипових моноцентриків) в УЛНА з онкопатологією ($0{,}16 \pm 0{,}05$ на 100 метафаз) достовірно не перевищувала ($p > 0{,}05$) аналогічний показник у осіб, хворих на РЛ без радіаційного впливу ($0{,}08 \pm 0{,}03$ на 100 метафаз) [4].

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл спостерігали вірогідне зростання ($p < 0{,}01$) середньогрупових частот аберантних метафаз та аберацій хромосом ($12{,}02 \pm 0{,}44\%$ та $46{,}83 \pm 0{,}67$ на 100 метафаз відповідно) порівняно з аналогічними показниками в інтактних культурах ($2{,}67 \pm 0{,}19\%$ та $2{,}96 \pm 0{,}20$ на 100 метафаз відповідно). Разом з тим при порівнянні частоти інтегральних цитогенетичних показників не виявили статистично значущих відмінностей у осіб з онкопатологією з та без додаткового радіаційного впливу.

Середня частота аберацій на одну аберантну метафазу в обох групах перевищувала 1 і становила 3,90 та 4,94 відповідно, внаслідок індукції клітин із множинними хромосомними аберраціями.

Таблиця 1. Результати цитогенетичного обстеження УЛНА з діагнозом РЛ (середньогрупові дані), $M \pm m$

Аберантні клітини, %	Хромосомні аберації, на 100 клітин	Частота аберацій хроматидного типу, на 100 клітин			Частота аберацій хромосомного типу, на 100 клітин					
		Одиночні фрагменти	Обміни	Сума	Парні фрагменти	Дицентрики	Центричні кільця	Аномальні моноцентрики	Ацентричні кільця	Сума
Без додавання блеоміцину										
2,67 ± 0,19	2,96 ± 0,20	1,39 ± 0,14	0,03 ± 0,02	1,42 ± 0,14	0,95 ± 0,12	0,27 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,10 ± 0,04	1,55 ± 0,15
З додаванням блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл										
12,02 ± 0,44	46,83 ± 0,67	31,79 ± 0,63	0,06 ± 0,03	31,86 ± 0,63	14,47 ± 0,47	0,30 ± 0,07	0,03 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,01 ± 0,01	14,98 ± 0,48
З додаванням блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл										
22,28 ± 0,64	80,28 ± 0,61	52,27 ± 0,77	0,15 ± 0,06	52,43 ± 0,77	27,87 ± 0,69	0,27 ± 0,08	0,02 ± 0,02	0,20 ± 0,07	0,17 ± 0,06	28,52 ± 0,69

Серед пошкоджень хромосом знов-таки значно домінували вільні ацентрики переважно хроматидного типу (одиночні ацентричні фрагменти) — як у окремих осіб, так і по групі в середньому, що не тільки характерно для кластогенної дії блеоміцину, але й вважається цитогенетичними маркерами хромосомної нестабільності. Частота обмінних аберацій хроматидного (хроматидні обміни) та хромосомного (дицентрики, кільцеві хромосоми, атипові моноцентрики) типів залишилась незмінною.

При аналізі індивідуальних результатів цитогенетичних досліджень при дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл у онкохворих УЛНА, як і в группі осіб з РЛ без додаткового радіаційного навантаження, спостерігали велику міжіндивідуальну варіабельність цитогенетичного ефекту, яка не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах. Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій у групі онкохворих УЛНА становив 16,86–99,50 на 100 клітин (при 8,20–109,25 на 100 метафаз у групі хворих на РЛ без додаткового радіаційного впливу), тобто як окремі індивіди, так і обстежена група в цілому виявилися чутливими до тестуючої дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл.

У групі онкохворих УЛНА при дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл (див. табл. 1) достовірно підвищився середньогруповий рівень аберантних метафаз та хромосомних аберацій — до $22{,}28 \pm 0{,}64\%$ та $80{,}28 \pm 0{,}61$ на 100 метафаз відповідно, але середня кількість аберацій в одній аберантній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і становила 3,60, що може бути зумовлено цитотоксичною дією більш високої концентрації блеоміцину. Основним типом хромосомних пошкоджень, індукованих блеоміцином, залишились прості аберації — одиночні та парні ацентрики.

Основні закономірності цитогенетичного відгуку групи УЛНА з РЛ на дію блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл відповідали таким, виявленим при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином у концентрації 0,05 мкг/мл, але з більш вираженим цитогенетичним ефектом.

Для порівняльної оцінки реакції хромосомного апарату осіб з обох груп онкохворих на дію блеоміцину використали два інтегральних критерія — відсоток осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, визначений за величиною коефіцієнта ПХН ($K_{\text{ПХН}}$, який при підвищеній чутливості до дії мутагенів-провокаторів перевищує 1), та середньогруповий додаток до фонової частоти хромосомних аберацій (надспонтанний рівень) у тесті "G_2-bleomycin sensitivity assay". Індивідуальні значення $K_{\text{ПХН}}$ в обстежених групах наведені в табл. 2.

На підставі величин $K_{\text{ПХН}}$ розрахували кількість осіб з прихованою хромосомною нестабільністю:

53,3% у групі хворих на рак легенів без додаткового радіаційного впливу, що підтверджує літературні дані щодо підвищення індивідуальної чутливості пацієнтів з реалізованою онкологічною патологією до дії мутагенів-провокаторів *in vitro* [6, 7];

66,6% у групі УЛНА, хворих на рак легенів, що дозволяє припустити обтяження прогнозу щодо реалізації онкопатології у гіперчутливих до дії блеоміцину осіб внаслідок індукції хромосомної нестабільності додатковим радіаційним впливом.

Аналогічні висновки можна зробити і на підставі аналізу величин надфонового цитогенетичного ефекту, індукованого блеоміцином в обстежених групах (табл. 3). Як видно з наведених даних, максимальний відсоток осіб з прихованою хромосомною нестабільністю (66,6%), як і максимальний додаток до середньогрупової частоти аберацій хромосом (77,32 на 100 метафаз при концентрації блеоміцину 5,00 мкг/мл), виявився в групі УЛНА з діагнозом РЛ.

Таблиця 2. Індивідуальні коефіцієнти прихованої хромосомної нестабільності ($K_{\text{ПХН}}$) в онкологічних хворих без та з додатковим радіаційним впливом

№ п/п	Онкологічні хворі, без додаткового радіаційного впливу [4]		Онкологічні хворі, які брали участь в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС	
	0,05 мкг/мл	5,00 мкг/мл	0,05 мкг/мл	5,00 мкг/мл
1	**2,32**	**1,78**	0,99	**1,21**
2	0,21	0,65	**2,17**	**1,20**
3	0,17	0,41	0,39	0,94
4	**1,32**	**1,18**	0,81	0,64
5	0,34	1,15	0,39	0,54
6	0,85	0,98	**1,55**	0,88
7	0,74	0,93	**1,33**	0,77
8	0,81	1,22	0,80	**1,03**
9	**1,33**	**1,08**	**1,26**	**1,14**
10	**1,59**	**1,11**	**1,03**	0,90
11	1,79	0,83	0,37	0,64
12	0,89	0,88	**1,72**	**3,13**
13	0,36	0,81	0,61	**1,23**
14	**1,69**	**1,31**	0,99	**1,83**
15	0,59	0,67*	0,92	0,90

Таблиця 3. Порівняння середньогрупових даних цитогенетичного обстеження хворих на РЛ без радіаційного впливу та після професійного контакту з іонізуючим випромінюванням при використанні тесту "G_2-bleomycin sensitivity assay"

Група хворих на РЛ	Гіперчутливі особи, %	Додаток до фонової частоти аберацій, на 100 клітин	
		0,05 мкг/мл	5,00 мкг/мл
Без радіаційного впливу [4]	53,3	44,59	53,41
УЛНА	66,6	43,87	77,32

Отримані результати не тільки підтвердили можливість радіаційно-індукованої модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином, але й дозволили припустити існування асоціації між радіаційно-індукованим підвищенням генетично зумовленої індивідуальної чутливості до тестуючої мутагенної дії блеоміцину та реалізацією онкологічної патології в опромінених осіб.

1. *Au W. W.* Mutagen sensitivity assays in population studies // Mutat. Res. – 2003. – **544**, Iss. 2–3. – P. 273–277.
2. *Цитогенетичний* спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою теста "G_2-bleomycin sensitivity assay": Метод. рекомендації / Уклад. М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан; Державна установа "Науковий центр радіаційної медицини АМН України". – Київ, 2008. – 25 с.
3. *Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р., Пілінська М. А.* Виявлення прихованої хромосомної нестабільності у осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою удосконаленого теста "G_2-bleomycin sensitivity assay" // Доп. НАН України. – 2009. – № 11. – С. 191–195.
4. *Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Швайко Л. І.* Використання модифікованого тесту "G_2-bleomycin sensitivity assay" для виявлення прихованої хромосомної нестабільності у хворих на рак легенів // Доп. НАН України. – 2011. – № 10. – С. 156–161.
5. *Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катосова Л. Д., Платонова В. И.* База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Вестн. РАМН. – 2001. – № 2. – С. 21–29.

6. *Szekely G., Remenar E., Rfsler M. et al.* Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? // Mutagenesis. – 2003. – **18**, No 1. – P. 59–63.
7. *Spitz M.* Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility // Cancer Detect. Prev. – 2005. – **19**, No 1. – P. 35.

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ

Надійшло до редакції 23.01.2012

М. А. Пилинская, С. С. Дыбский, Е. Б. Дыбская, Л. И. Швайко, В. А. Сушко

Реализация скрытой хромосомной нестабильности в лимфоцитах периферической крови участников ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС, больных раком легких

С помощью модифицированного теста "G_2-bleomycin sensitivity assay" определен надфоновый цитогенетический эффект, величина которого считается маркером скрытой хромосомной нестабильности (СХН), у участников ликвидации последствий Чернобыльской аварии, больных раком легких. Обнаружены существенные межиндивидуальные колебания индуцированного цитогенетического эффекта и отсутствие положительной корреляции между фоновыми и надфоновыми частотами хромосомных аберраций, что обусловлено индивидуальной чувствительностью к мутагенному действию блеомицина. Сделано предположение о существовании ассоциации между радиационно-индуцированным повышением генетически детерминированной индивидуальной чувствительности к тестирующей мутагенной нагрузке и реализацией онкологической патологии у облученных лиц. Подтверждена целесообразность использования теста "G_2-bleomycin sensitivity assay" при медицинском обследовании облученных контингентов для определения величины СХН как одного из информативных маркеров предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

M. A. Pilinskaya, S. S. Dibskiy, Ye. B. Dibskaya, L. I. Shvayko, V. A. Sushko

Realization of hidden chromosome instability in peripheral blood lymphocytes of the Chernobyl accident clean-up workers with lung cancer

With the help of the modified "G_2-bleomycin sensitivity assay", the hidden chromosome instability (HCI) in patients with lung cancer occupationally exposed to ionizing radiation under the liquidation of consequences of the Chernobyl accident has been evaluated. The essential interindividual variability in the addition to the background frequency of chromosome aberrations (above spontaneous cytogenetic effect), as well as the absence of positive correlation between background and induced frequencies of chromosome damages due to different individual sensitivities to the testing mutagenic exposure, has been established. The existence of the association between the radiation-induced increase of a genetically determined individual susceptibility to the bleomycin exposure and the realization of cancer pathology in irradiated individuals has been suggested. The data obtained confirm the feasibility of using the "G_2-bleomycin sensitivity assay" in the medical examination of irradiated contingents for the determination of HCI value as one of the informative markers of the predisposition to oncological diseases.