

Е.А. ДЬОМІНА<sup>1</sup>, Н.М. РЯБЧЕНКО<sup>1</sup>, І.Р. БАРИЛЯК<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

E-mail: drozd@onconet.kiev.ua

<sup>2</sup> Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ

## ІНДИВІДУАЛЬНА РАДІОЧУТЛИВІСТЬ ЛЮДИНИ: ЦИТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ



*Відповідно до фундаментальних положень радіаційної цитогенетики розроблено та апробовано схему цитогенетичного дослідження індивідуальної радіочутливості умовно здорових осіб з використанням хромосомного тесту ( $G_2$ -assay).*

© Е.А. ДЬОМІНА, Н. М. РЯБЧЕНКО, І.Р. БАРИЛЯК, 2007

**Вступ.** Розробка підходів, що дозволяють оцінити і прогнозувати індивідуальну радіочутливість (ІР) організму людини, вивчення механізмів її формування — актуальна проблема сучасних досліджень як в області фундаментальної радіобіології, так і радіаційної онкології. Дослідження ІР в Україні пов'язано в першу чергу з наслідками Чорнобильської аварії, оскільки хронічне опромінення в малих дозах — постійно діючий екологічний фактор на окремих територіях, що призводить до істотної дестабілізації геному клітин опромінених осіб та може виступати в ролі непрямого індуктора захворювань стохастичної природи, про що свідчить підвищений рівень онкологічної захворюваності в радіаційно-забруднених районах України та серед «ліквідаторів» [1, 2]. Безпосередньо з цієї проблемою пов'язані також питання нормування роботи на радіаційно-забруднених територіях, підбору кадрів для роботи на підприємствах атомної енергетики, оцінки співвідношення «користь—шкода» при повторних рентгенологічних обстеженнях осіб з хронічними захворюваннями, з ослабленим імунітетом, а також при тривалих контрастних обстеженнях (іригоскопія, катетеризація судин тощо).

Вперше спроби прогнозування ІР людини були здійснені в середині минулого століття, коли в науковій літературі прогностична термінологія взагалі не згадувалась, проте дослідження з прогнозування ІР людини не одержали належного розвитку, оскільки увагу дослідників-радіобіологів було зосереджено в основному на проблемі біологічної дозиметрії/індикації променевих уражень, вивченні характеру залежностей «доза—ефект», «час—ефект» тощо.

Відповідно до сучасних уявлень, ІР — це інтегральна реакція окремого організму на опромінення, і її варіабельність залежить не тільки від характеристики радіаційного фактора (величина, потужність дози, якість іонізуючого випромінювання тощо), а й від генетичних факторів, активності відновлювально-компенсаторних процесів, а також специфічності дії різних факторів навколишнього середовища.

За останній час розуміння природи та механізмів радіаційної загибелі клітин значно змінилося, що пов'язано в першу чергу з вивченням молекулярно-генетичних механізмів процесів репарації, регуляції клітинного циклу, апоптозу. Формування відповіді організму на дію радіації залежить від індивідуальних особливос-

тей стану складної, генетично підконтрольної сигнальної системи в клітинах [3], подальше вивчення якої може зумовити розробку та впровадження принципово нових методів управління ІР. У ряді випадків виявлено генетичну схильність до підвищеної радіочутливості в поєднанні зі знизеними репаративними можливостями клітини, змінами в регуляції клітинного циклу, реактивності організму, відхиленнями в показниках клітинного та гуморального імунітету, що сприяє підвищенню ризику розвитку злоякісних новоутворень (ЗН) приблизно в 10 разів. Більшість даних при вивченні ІР людини одержано при обстеженні хворих із вторинними пухлинами, що виникли після проведення променевої терапії в дитячому віці з приводу ретинобластоми, хвороби Ходжкіна тощо [4, 5]. В низці досліджень показано, що саме дестабілізація хромосомного апарату імунокомпетентних клітин (лімфоцитів) опромінених осіб може бути показником схильності до розвитку ЗН, а аналіз аберацій хромосом – об'єктивний метод оцінки даного стану. Розробка цитогенетичних методичних підходів до вивчення ІР людини почалась з обстежень пацієнтів з рідкісними синдромами спадкової нестабільності хромосом [6], а також онкологічних хворих [7]. Показано, що 40 % хворих з пухлинами молочної залози, 30 % – прямої кишки, 30 % – голови і шиї відрізняються підвищеною радіочутливістю хромосом різних соматичних клітин. Сучасний підхід до визначення ІР акцентується на оцінці цитогенетичних ефектів, індукованих тестуючим опроміненням в постсинтетичному періоді мітотичного циклу соматичних клітин людини, що лежить в основі  $G_2$ -тесту ( $G_2$ -assay) [8].

Нам невідомі праці, в яких систематизовано досліджувалась ІР саме умовно здорових осіб на основі цитогенетичних обстежень ( $G_2$ -тест). Вважаємо такі дослідження актуальними, враховуючи постійну дію радіонуклідів у постчорнобильському періоді.

Мета роботи – дослідити індивідуальну радіочутливість умовно здорових осіб з використанням модифікованого цитогенетичного тесту ( $G_2$ -assay).

**Матеріали і методи.** До групи обстежених увійшли 80 умовно здорових киян віком 22–50 років, які на момент обстеження не мали

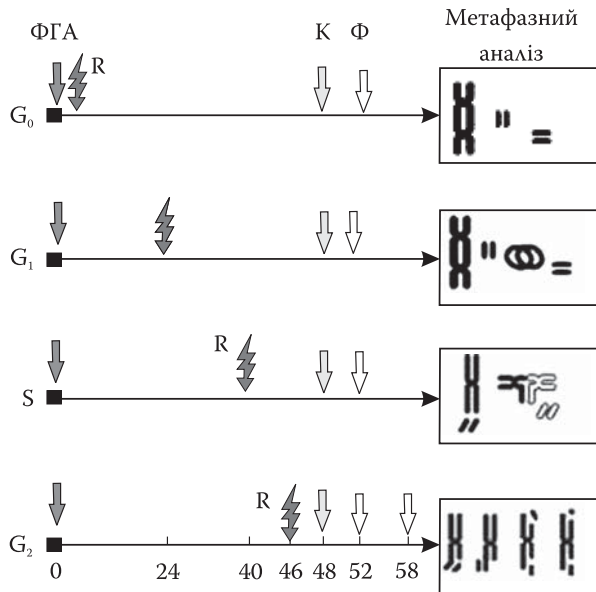
свідомого контакту із джерелами іонізуючого випромінювання, а також іншими генотоксичними агентами. Культивування лімфоцитів здійснювали за модифікованим методом Хангерфорда [9] з використанням живильного середовища RPMI 1640 («Sigma», Німеччина) та РНА-М («Gibco-Invitrogen», США). Клітини інкубували при 37 °С протягом 52 і 58 год (з урахуванням радіаційно-індукованої затримки мітозу), що дозволило аналізувати клітини в першому післяпроменевому мітозі. Тестуюче  $\gamma$ -опромінення культури здійснювали на терапевтичному апараті «Рокус» в дозі 1,5 Гр при потужності дози 1 Гр/хв на 46-й годині інкубації клітин, що відповідало  $G_2$ -стадії мітотичного циклу (перший мітоз в культурі).

Традиційно пофарбовані препарати аналізували на стадії метафази з елементами візуального каріотипування.

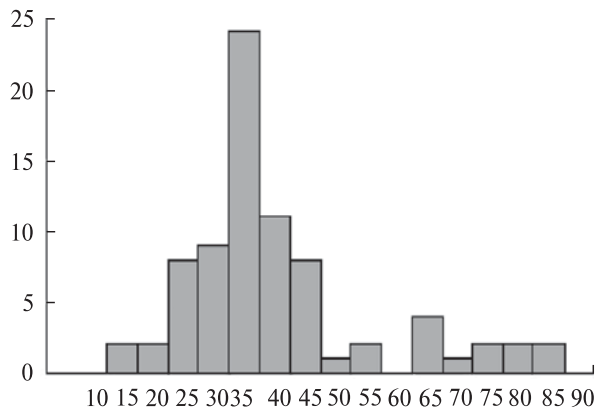
Для одержаних цитогенетичних показників визначали характер розподілу та їх варіабельність. Коефіцієнт варіації визначали як  $CV = (SD \div M) \cdot 100 \%$ , де  $SD$  – стандартна похибка,  $M$  – середнє значення. Варіації індивідуальної радіочутливості між донорами (міжіндивідуальна варіабельність) та показниками для окремого донора (внутрішньоіндивідуальна варіабельність) порівнювали за допомогою F-тесту. Після побудови гістограм розподілу одержаних даних визначали граничні значення показників радіочутливості за допомогою 90-го перцентилію. Рівень значущості ( $p$ ) в усіх випадках був  $\leq 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.**  
**Схема цитогенетичного дослідження умовно здорових осіб.** Розроблена схема (рис. 1) базується на класичних положеннях радіаційної цитогенетики, відповідно до яких поєднання таких факторів, як величина дози радіації, стадії мітотичного циклу, постпроменеві умови, відображається на кількісній та якісній варіації радіочутливості клітин.

1. *Спектр аберацій хромосом.* Досліджено, що у міру просування клітин по циклу спостерігається закономірна зміна аберацій хромосомного типу на хроматидний, максимум яких реєструється в  $G_2$ -стадії. Таким чином, у першій половині мітотичного циклу переважають аберації обмінного типу, у другій – фрагменти. Ми визначили час опромінення



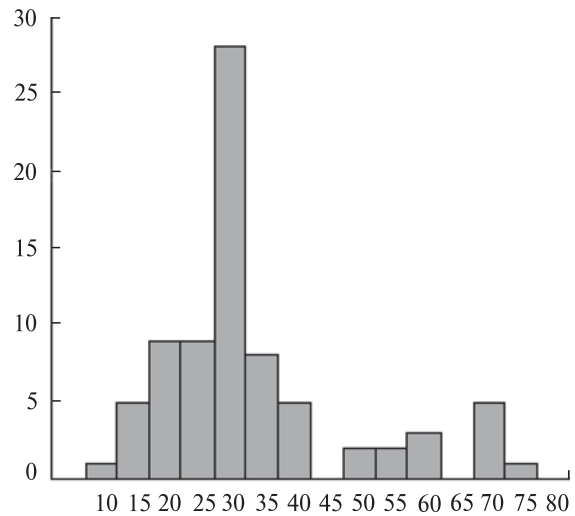
**Рис. 1.** Схема досліджень для визначення індивідуальної радіочутливості та з'ясування механізмів її формування на хромосомному рівні лімфоцитів периферичної крові умовно здорових осіб: по вертикалі – стадії мітотичного циклу; по горизонталі – година інкубації; ФГА – фітогемаглютинін, R – гамма-опромінення, К – колцемід, Ф – фіксація



**Рис. 2.** Розподіл загального числа хроматидних аберацій на 100 метафаз (по горизонталі) в лімфоцитах умовно здорових донорів (по вертикалі) при тестувальному опроміненні

культури: 46 год інкубації клітин, що відповідає кінцю  $G_2$ -періоду лімфоцитів.

2. *Доза тестуючого опромінення.* Встановлено лінійну дозову залежність числа фрагментів при опроміненні в  $G_2$ -стадії в широкому діапазоні доз. Нами визначено дозу тестувального  $\gamma$ -опромінення 1,5 Гр, при якій значення міто-



**Рис. 3.** Розподіл загального числа хроматидних делецій 100 метафаз (по горизонталі) в лімфоцитах умовно здорових донорів (по вертикалі) при тестувальному опроміненні

тичного індексу дозволяють реєструвати достатнє для об'єктивної оцінки радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекта число метафаз (100–200 метафаз на одне спостереження) і, як буде показано нижче, реєструвати індивідуальні розбіжності чутливості каріотипу обстежених осіб до тестуючого опромінення.

3. *Радіаційно-індукована затримка мітозу.* Виконано фіксацію клітин, опромінених в  $G_2$ -стадії, у двох термінах – 52 і 58 год від початку культивування.

4. *Вихід аберантних клітин при гамма-опроміненні* в різних стадіях мітотичного циклу має такі ж залежності, що й сумарне число аберацій хромосом.

*Визначення варіабельності IP умовно здорових осіб на основі цитогенетичного обстеження з використанням  $G_2$ -тесту.* Вивчення цитогенетичних показників індивідуальної радіочутливості 80 умовно здорових осіб виявило їх варіабельність – від 18 до 124 аберацій хромосом на кожні 100 проаналізованих клітин при середньому груповому значенні  $38,4 \pm 15$ ; коефіцієнт варіації склав 34 %. Для порівняння визначали варіабельність показників при тестувальному опроміненні в  $G_1$ -періоді, яка була значно менш виражена: коефіцієнт варіації становив 14 %. В спектрі радіаційно-індукованих аберацій хромосом  $G_2$ -періоду (при першо-

му терміні фіксації культивування лімфоцитів, першому мітозі в культурі та після опромінення) переважали фрагменти хроматидного типу, що склали 90 % загального числа пошкоджень. Середнє значення делецій становило  $31,7 \pm 1,7$ , стандартне відхилення – 14,6, коефіцієнт варіації – 36 %.

Вивчення характеру розподілу частоти загального числа хроматидних аберацій і хроматидних делецій (рис. 2 та 3) показало, що одержаний розподіл цитогенетичних даних не є нормальним. В цьому випадку визначення 90-го перцентилу як граничного значення норми дозволяє виявити, що 10–12 % осіб за цими показниками мають підвищену IP хромосом до опромінення. При цьому середні значення загальної частоти хроматидних аберацій в групі нормальних донорів становили  $33,7 \pm 9,4$ , тоді як в групі осіб з підвищеною IP –  $74 \pm 7,2$  аберацій на 100 проаналізованих метафаз.

Розроблена схема цитогенетичного обстеження контингенту умовно здорових осіб пропонується для виявлення серед них гіперчутливих до радіації та передбачає збір анамнезу, тобто дані про свідомий контакт обстеженого з джерелами радіації та іншими мутагенними факторами, про шкідливі звички тощо.

**SUMMARY.** In accordance with the fundamental principles of the radiation cytogenetics the scheme of cytogenetical examinations of individual radiosensitivity of relatively healthy donors on the basis of chromosomal test ( $G_2$ -assay) has been developed and tested.

**РЕЗЮМЕ.** В соответствии с фундаментальными положениями радиационной цитогенетики разработана и апробирована схема цитогенетического исследова-

ования индивидуальной радиочувствительности условно здоровых лиц с использованием хромосомного теста ( $G_2$ -assay).

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сердюк А.М. Медико-экологические последствия Чернобыльской катастрофы // Врачеб. дело. – 1997. – № 1. – С. 3–9.
2. Дьоміна Е.А. Вплив опромінення на виникнення злоякісних новоутворень у ліквідаторів аварії на ЧАЕС // Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. – 2001. – Вип. 1 (33). – С. 68–75.
3. Khanna K.K., Jackson S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection // Nat. Genet. – 2001. – 27. – P. 247–254
4. Пелевина И.И. и др. Адаптивный ответ – проявление на клеточном уровне организма // Хроническое радиационное воздействие: медико-биологические эффекты : Материалы III Междунар. симпоз. – Челябинск, 2005. – С. 13.
5. Streffer C. Genetische predisposition und strahlenempfindlichkeit bei normalen gewebe // Strahlenther. Onkol. – 1997. – 173. – P. 462–468.
6. Leong T., Borg M., McKay M. Clinical and cellular radiosensitivity in inherited human syndromes // Clin. Oncol. – 2004. – 16. – P. 206–209.
7. Baria K., Warren C., Roberts S.A., West C.M., Scott D. Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? // Brit. J. Cancer. – 2001. – 84, № 7. – P. 892–896.
8. Scott D., Barber J.B., Spreadborough A. R., Burrill W., Roberts S.A. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays // Int. J. Radiat. Biol. – 1999. – 75. – P. 1–10.
9. Дьоміна Е.А., Н.М. Рябченко Оцінка індивідуальної радіочутливості умовно здорових осіб на основі розробленої схеми цитогенетичного обстеження // Лаб. діагностика. – 2006. – № 2 (36). – С. 30–34.

Надійшла 25.10.06