secretions" In: New Trends in Biochemical Physics Research, Editors: S.D. Varfolomeev et al., pp. 73-82, NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 128.
8. *Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V. and Yamskov I.A.* "Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties.", pp. 61-70 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. and Zaikov G.E., Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
9. *Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A.* "Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing", pp. 71-78 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
10. *Stepanek P.* Dynamic Light Scattering. The method and some applications // Ed. By Brown W. Oxford: Clarendron Press. 1993. P. 177

Резюме
В ткани семенников крыс был идентифицирован биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах на поддержание структуры семенных канальцев и препятствие гибели клеток семенников в условиях переживающей органотипической культуры *in vitro*.
In a tissue of rats testis have been identified a bioregulator active in ultra low dozes on maintenance of structure of tubuli seminiferi and an obstacle of destruction of testis cells in conditions of experiencing organotypic culture in vitro.

ПІЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.
Науковий Центр радіаційної медицини АМН України,
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: pww@ukr.net

РЕАЛІЗАЦІЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ У ВІДДАЛЕНІ СТРОКИ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

Оцінка прихованої хромосомної нестабільності є перспективним напрямком цитогенетичних досліджень, які впродовж останніх 10-ти років проводяться в різних цитогенетичних лабораторіях світу, переважно, для визначення ризику виникнення спонтанної чи індукованої онкопатології за гіперчутливістю хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до кластогенної дії т. з. мутагенів-провокаторів, одним з яких є радіоміметик блеоміцин [1]. Встановлено, що індивідуальна чутливість хромосом соматичних клітин до тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro* не залежить від статі, віку людини та повсякденного навантаження мутагенними факторами довкілля і є генетично детермінованою, що обумовлено певними молекулярно-генетичними механізмами та доведено відповідними дослідженнями на близнюках [2 - 6].

Питання щодо модифікації генетично детермінованої міжіндивідуальної чутливості геному людини до дії мутагенів довкілля, включаючи іонізуюче випромінювання, досі залишається відкритим. Разом з тим, враховуючи актуальність цієї проблеми в зв'язку з медичними наслідками Чорнобильської аварії, метою нашого дослідження було саме визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини у віддалені строки після радіаційного впливу різної інтенсивності.

Для досягнення цієї мети нами було удосконалено модельну систему для дослідження прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини за допомогою тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином *in vitro* - «G_2 bleomycin sensitivity assay» [7]. Проведена робота дозволила розробити алгоритм для оцінки ступеню індивідуальної чутливості хромосом соматичних клітин людини до кластогенної дії блеоміцину.

Удосконалений нами тест "G_2 bleomycin sensitivity assay" було апробовано в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від осіб з групи порівняння із вихідною частотою хромосомних аберацій, що не перевищувала спонтанний рівень, і виявлено 30% індивідів, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора [8]. Виходячи з анамнезу цих осіб (відсутність контакту із знаними чи потенційними мутагенами), одержані результати підтвердили дані інших авторів про те, що індивідуальна гіперчутливість до генотоксичного впливу, як і резистентність до нього, у інтактних індивідів обумовлюється генетичними факторами.

Матеріал та методи

Провели добровільне цитогенетичне обстеження 9-ти осіб з групи порівняння (умовно здорові донори, 3 жінки, 6 чоловіків у віці 18–64 роки), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами, та 44-х осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності в анамнезі. Серед опромінених осіб сформували наступні групи:

- реконвалесценти гострої променевої хвороби (ГПХ) (через ~20 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження) – 19 осіб, всі чоловіки віком 41–73 роки, середній вік – 57 років;
- ліквідатори наслідків аварії на ЧАЕС (через ~ 19 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження) – 10 осіб, всі чоловіки віком 40–73 роки, середній вік – 56 років;
- робітники, які працювали в 30-км зоні відчуження у 2006–2007 рр. – 12 осіб, всі чоловіки віком 24–58 років, середній вік – 41 рік.

У вищезазначених групах визначали фонові та індуковані блеоміцином частоти всього спектру хромосомних аберацій в культурі лімфоцитів периферичної крові. Умови культивування лімфоцитів і приготування препаратів метафазних хромосом, принципи проведення цитогенетичного аналізу та обліку хромосомних аберацій, особливості обробки культур блеоміцином відповідали таким, що були викладені в попередній публікації [8].

Фоновий цитогенетичний ефект в інтактних культурах, одержаних від обстежених осіб, використовували як критерій факту та інтенсивності опромінення за цитогенетичними індикаторами радіаційної дії (нестабільними та стабільними аберраціями хромосомного типу) [9].

Визначення осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, проводили аналогічно виявленню індивідів з підвищенною чутливістю до дії іонізуючої радіації [9, 10] обчисленням коефіцієнту прихованої хромосомної нестабільності ($К_{ПХН}$) за спрощеною нами формулою :

$К_{ПХН} = М_{ПХН}/М$, де $М_{ПХН}$ – індивідуальні значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл; М – середньогрупові значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл. Прийняли, що для гіперчутливих осіб цитогенетичний ефект, індукований блеоміцином, перевищує середньогруповий рівень хромосомних аберацій і тому $К_{ПХН}$ в них завжди буде > 1.

Результати та обговорення

За результатами фонового цитогенетичного обстеження найменш обтяженою з експонованих груп виявилася група осіб, яка працювала в 30-км зони відчуження у 2006–2007 рр.(хронічний радіаційний вплив малої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення, суворий радіологічний контроль). Середньогрупова частота радіогенних

маркерів в цій групі (0,07±0,03 на 100 метафаз) не перевищувала такий в групі порівняння (0,22±0,08 на 100метафаз). Далі йдуть групи ліквідаторів наслідків Чорнобильської аварії (пролонгований радіаційний вплив середньої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986–1987 рр.) та осіб, які перехворіли на ГПХ (гостра радіаційна дія значної інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986 р.), в яких навіть у віддалені строки після опромінення спостерігали вірогідно ($p<0,05$) підвищені частоти як залишкових (неелімінованих) нестабільних хромосомних маркерів радіаційної дії (0,31±0,08 та 0,41±0,08 100 метафаз, відповідно), так і первинних радіаційно-індукованих стабільних хромосомних аберацій (0,17±0,07 та 0,48±0,09 на 100 метафаз, відповідно).

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота аберацій хромосом в групі реконвалесцентів ГПХ складала 16,80±0,50 на 100 метафаз, що достовірно ($p<0,01$) відрізнялось від такої в інтактних культурах (3,33±0,22 на 100 метафаз). Додаток до фонової средньогрупової частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) зріс до 13,47 на 100 метафаз, що перевищувало такий в групі порівняння (9,14 на 100 метафаз). При аналізі індивідуальних цитогенетичних параметрів встановили суттєву міжіндивідуальну варіабельність індукованої блеоміцином частоти хромосомних аберацій, яка, як правило, не залежала від величин фонових даних, одержаних в інтактних культурах. Так, розмах коливань частоти аберацій хромосом варіював в межах 8,7 - 38,2 на 100 метафаз. В 14-ти випадках цей показник вкладався в діапазон 8,3 – 15,5 на 100 метафаз і не перевищував середньогруповий рівень (16,8 на 100 метафаз). У 5-ти обстежених осіб частота аберацій хромосом складала 22,5; 35,7; 38,2; 30,0; 25,0 на 100 клітин при 1,50; 1,67; 2,20; 3,00; 4,00 в інтактних культурах. Таким чином, використання блеоміцину як мутагена-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати 5 осіб з підвищеною чутливістю до тестуючої дії блеоміцину.

При дії блеоміцину в концентрації 5,0 мкг/мл в групі реконвалесцентів ГПХ зросли як індивідуальні частоти хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до 28,04±0,63 на 100 метафаз). Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також вірогідно підвищилась і по групі в середньому становила 24,71 на 100 метафаз. Реакція хромосомного апарату на дію мутагена-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл суттєво відрізнялась у різних осіб. Окрім трьох гіперчутливих індивідів, виявлених при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином в концентрації 0,05 мкг/мл, при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл було ідентифіковано ще 6 осіб із прихованою хромосомною нестабільністю. Частота хромосомних аберацій у цих індивідів становила 45,5; 53,0; 50,0; 33,5; 48,0; 36,5 на 100 клітин, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 6,6 до 16,5 на 100 метафаз і була нижче за середньогруповий рівень. Таким чином, з використанням двох тестуючих концентрацій блеоміцину в групі реконвалесцентів ГПХ виявлено 11 осіб (57,9 %), гіперчутливих до дії мутагена-провокатора ($К_{ПХН}$ в яких перевищували 1), що, виходячи з їх анамнезу, може бути обумовлено дією високих доз опромінення.

В групі ліквідаторів частота хромосомних аберацій на 100 метафаз коливалась від 2,34 до 34,00 при концентрації 0,05 мкг/мл та від 3,00 до 34,50 при концентрації 5,0 мкг/мл і в середньому становив 11,26±0,63 та 15,10±0,79, відповідно. Середньогруповий надспонтанний (індукований) рівень хромосомних аберацій складав 7,95 та 11,79 на 100 клітин, відповідно, що було навіть менш ніж в групі порівняння (9,14 та 14,31 на 100 клітин, відповідно). При концентрації блеоміцину 0,05 мкг/мл виявлено одну особу з підвищеною чутливістю до дії препарату, частота аберацій хромосом в якої була максимальною - 34,0 на 100 метафаз, тоді як у решти обстежених вона коливалась в межах 2,3 – 13,7 на 100 клітин. При дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл, окрім того ж індивіда, ідентифіковано ще дві гіперчутливих особи з рівнем хромосомних аберацій 20,00 та 19,33 на 100 клітин, відповідно при міжіндивідуальному розкиді у решти осіб 3,0 – 15,3 на 100 метафаз. Таким чином, всього серед ліквідаторів

виявлено 3 особи з прихованою хромосомною нестабільністю (30,0%), що не відрізняється від групи порівняння.

Працівники 30-км зони, як і особи з інших обстежених груп (експонованих та контрольної), суттєво відрізнялись за індивідуальною частотою хромосомних аберацій, індукованою обома тестуючими концентраціями блеоміцину. Так, міжіндивідуальний розкид цього показника становив 6,00 – 73,67 на 100 метафаз при концентрації 0,05 мкг/мл та 10,00 – 81,50 на 100 клітин при концентрації 5,0 мкг/мл. Середньо-групові рівні хромосомних аберацій складали 23,70±0,67 та 34,04±0,80 на 100 клітин; додатки до спонтанного рівня – 22,00 та 32,34 на 100 метафаз, відповідно (максимальні серед усіх обстежених груп). При концентрації блеоміцину 0,05 мкг/мл ідентифіковано 3 особи із прихованою хромосомною нестабільністю, частота хромосомних аберацій в яких складала 61,5±3,44, 73,67±2,54, 59,00±2,84 на 100 метафаз. При дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл, окрім вищезазначених осіб, виявили ще одного гіперчутливого індивіда; частота хромосомних аберацій в якого становила 40,33±2,83 на 100 метафаз. Таким чином, при обох концентраціях блеоміцину у 33,3% обстежених спостерігали підвищену чутливість до тестуючої мутагенної дії, що не відрізняється від такої в групах порівняння та ліквідаторів. Разом з тим, саме в цій групі, особливо яскраво виявилася відсутність позитивної кореляції між фоновими та індукованими частотами хромосомних аберацій (наприклад, у випадку № 1 з нульовою фоновою частотою та максимальним індукованим цитогенетичним ефектом).

Висновки. Отримані результати підтвердили реальність радіаційно-індукованої модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження, яка залежить від інтенсивності та характеру опромінення.

Література

1. *Spitz M.* Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility. // Cancer Detect. and Prevention. – 2005. – Vol. 19, № 1. – P. 35.
2. Bleomycin test sensitivity in healthy children / *S. Zajaczek, G. Krzanowska-Michalska, E.Pikula et al.* / Abstracts of 4th Europ. Cytogenetics Conf., Bologna. – 2003. – P. 43.
3. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity / *Jarno Tuimala, Gabor Szekely, Sharolta Gundy et al* // Mutagen**esi**s 2006. - V. 21, №4.- P:261-264.
4. Mutagen sensitivity has high heritability : Evidence from a twin study/Xifeng Wu; Spitz M. R.; Amos Ch. et al. //Cancer Research, 2006.- V.66, №12.- P.5993-5996.
5. Mutagen Sensitivity and Genetic Variants in Nucleotide Excision Repair Pathway: Genotype-Phenotype Correlation/ *Jie Lin, Gary E. Swan, Peter G. Shields et al* //, Cancer Research 2007.- V. 67, № 4.- P. 3493-3495.
6. Micronuclei frequency induced by bleomycin in human peripheral lymphocytes: Correlating BLHX polymorphism with mutagen sensitivity/ *R. Maffei, F. Carbone, S.Angelini et al* // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2008.- V. 639, Issues 1-2.- P. 20-26.
7. Цитогенетичний спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тесту G_2- bleomycin sensitivity assay / *М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан:* Методичні рекомендації.- К., 2008. – 23 с.
8. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Педан Л.Р.* Прихована хромосомна нестабільність, виявлена при тестуючій мутагенній дії блеоміцина *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові контрольних донорів./ Доповіді Національної Академії Наук України, 2008.- № 8, с. 184-188.
9. Радиационная цитогенетика: Русско-английский словарь-справочник /*Э.А. Дёмина, М.А. Пилинская, Ю.И. Петунин, Д.А. Клюшин.* – К.: Здоров'я, 2009. – 367 с.
10. *Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М*. Індивідуальна радіочутливість людини / ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – К.: Логос, 2006. – 126 с.

Резюме
Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності за допомогою тесту «G_2-bleomycin sensitivity assay» проведено добровільне цитогенетичне обстеження 53-х осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності Отримані дані підтвердили реальність модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.

Для выявления скрытой хромосомной нестабильности с помощью теста «G_2-bleomycin sensitivity assay» проведено добровольное цитогенетическое обследование 53-х лиц с радиационным воздействием разной интенсивности. Полученные данные подтвердили реальность модификации генетически обусловленной чувствительности хромосом соматических клеток человека к тестирующей мутагенной нагрузке вследствие действия высоких доз ионизирующего излучения.

For the revealing of hidden chromosome instability with the help of "G_2-bleomycin sensitivity assay" the voluntary observation of 53 persons with different intensity of radiation exposure had been fulfilled. The data received confirmed the reality of modification by high doses of ionizing radiation the inherited susceptibility of human somatic cells chromosomes to testing mutagenic exposure.

ПИЛИПЕНКО И.В.[1], ЧЕРДЫНЦЕВА Н.В.[2], КОБЗЕВ В.Ф.[1], ВОЕВОДА М.И.[1,3], РОМАЩЕНКО А.Г.[1]
[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,
[2]НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск,
[3]НИИ Терапии СО РАМН, Новосибирск,
Россия, 630090, Новосибирск, ул. пр. ак. Лаврентьева, 10, e-mail: myagkova_irina@rambler.ru

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА P53 С ФОРМИРОВАНИЕМ И РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ОПУХОЛИ

В последние годы наблюдается тенденция увеличения доли гормонозависимых опухолей органов репродуктивной системы у женщин со злокачественными новообразованиями. Это является следствием возрастания в популяции лиц с эндокринно-обменными нарушениями (ановуляция, гиперэстрогения, бесплодие, ожирение, сахарный диабет и т.д.). Кроме того, в патогенез гормонозависимых/независимых опухолей продолжают вносить существенный вклад генетические и внешние факторы (канцерогены). В результате в экономически развитых странах отмечено заметное превалирование рака молочной железы (РМЖ) над другими типами новообразований.

Молекулярные фенотипы эпителиальных клеток молочной железы различаются в норме концентрацией цитоплазматических и ядерных рецепторов женских гормонов, которые участвуют во многих клеточных процессах (экспрессии генов, дифференцировке и размножении клеток и т.д.). Малигнизированные эпителиальные клетки молочной железы, экспрессирующие рецепторы стероидных гормонов в существенном количестве, регулируются ими. Клетки опухолей, с низким содержанием этих рецепторов, перестают опознаваться циркулирующими гормонами как клетки-мишени, что приводит к утрате эндокринного контроля и нарастанию автономности. Количество рецепторов в клетках рака молочной железы может служить индикатором