



УДК 576.312.32/38;612.014.482

© 2009

С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан, М. А. Пілінська

**Виявлення прихованої хромосомної нестабільності  
у осіб, що постраждали від дії факторів  
Чорнобильської аварії, за допомогою удосконаленого  
тесту “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay”**

*(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)*

*За допомогою модифікованого тесту “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay” проведено добровільне цитогенетичне обстеження інтактних донорів та осіб, які зазнали радіаційного впливу різної інтенсивності. В усіх обстежених групах встановлено широке міжіндивідуальне варіювання цитогенетичного ефекту при дії блеомицину і відсутність позитивної кореляції поміж фоновими та індукованими частотами хромосомних аберацій. У контрольній групі та серед осіб з низькими дозами опромінення ~33% індивідів виявилися гіперчутливими до дії блеомицину, що, виходячи з їх анамнезу, можна вважати генетично зумовленим феноменом. Серед ліквідаторів Чорнобильської аварії, які перехворіли на гостру променеву хворобу, у 57,9% обстежених визначено приховану хромосомну нестабільність. Зроблено припущення про можливість модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до мутагенного навантаження внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.*

Оцінка прихованої хромосомної нестабільності є новим напрямком цитогенетичних досліджень, які впродовж останніх десяти років інтенсивно 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 так званих мутагенів-провокаторів, одним з яких є радіоміметик блеомицин [1–3]. Встановлено, що індивідуальна чутливість хромосом соматичних клітин до тестуючої мутагенної дії блеомицину *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 [4–8].

Питання щодо модифікації генетично детермінованої міжіндивідуальної чутливості гену людини до дії мутагенів довкілля, включаючи іонізуюче випромінювання, досі залишається відкритим. Враховуючи актуальність цієї проблеми у 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 поставленої мети нами насамперед було удосконалено модельну систему для дослідження прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини за допомогою тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином *in vitro* — “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay” [9]. Проведена робота дозволила розробити алгоритм для оцінки ступеня індивідуальної чутливості хромосом соматичних клітин людини до кластогенної дії блеоміцину — визначено оптимальні строки обробки культури лімфоцитів мутагеном (пізня постсинтетична G<sub>2</sub> стадія мітотичного циклу) та концентрації препарату (0,05 та 5,00 мкг/мл), придатні для оцінки чутливості хромосом соматичних клітин людини *in vitro* до мутагенного навантаження; доведено, що критерієм чутливості хромосом до тестуючої мутагенної дії блеоміцину доцільно вважати загальну частоту аберацій хромосом, а не аберацій метаз.фаз.

Удосконалений нами тест “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay” було апробовано в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від осіб з групи порівняння з вихідною частотою хромосомних аберацій, що не перевищувала спонтанний рівень, і виявлено 30% індивідів, гіперчутливих до дії мутагену-провокатора [10]. Виходячи з анамнезу цих осіб (відсутність контакту із відомими чи потенційними мутагенами), одержані результати підтвердили дані інших дослідників про те, що індивідуальна гіперчутливість до генотоксичного впливу, як і резистентність до нього, у інтактних індивідів обумовлюється генетичними факторами [6].

Для виявлення можливої модифікації опроміненням прихованої хромосомної нестабільності з використанням “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay” нами проведено добровільне цитогенетичне обстеження 44 осіб, з яких сформовано чотири групи спостереження з радіаційним впливом різної інтенсивності в анамнезі:

реконвалесценти гострої променевої хвороби (ГПХ) (через ~ 20 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження; гострий радіаційний вплив великої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення) — 19 осіб, усі чоловіки віком 41–73 роки, середній вік 57 років;

ліквідатори наслідків аварії на ЧАЕС (через ~ 19 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження; пролонгований радіаційний вплив середньої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення) — 10 осіб, усі чоловіки віком 41–73 роки, середній вік 56 років;

механізатори сільського господарства, які мешкали та працювали в зоні обов'язкового відселення (с. Поліське, Поліського р-ну Київської обл.), забрудненій радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС (постійний радіаційний вплив середньої інтенсивності; зовнішнє та внутрішнє опромінення) — 3 особи, усі чоловіки віком 43–52 роки, середній вік 47 років;

робітники, які працювали в 30-км зоні відчуження у 2006–2007 рр. (хронічний радіаційний вплив малої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення) — 12 осіб, усі чоловіки віком 24–58 років, середній вік 41 рік.

В усіх вищезазначених осіб визначено фонові частоти всього спектра хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові для порівняльної міжгрупової оцінки інтенсивності опромінення за цитогенетичними критеріями.

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності проведено обробку культур лімфоцитів блеоміцином за розробленим нами алгоритмом. Умови культивування лімфоцитів та принципи цитогенетичного аналізу відповідали таким, що описані в роботі [10].

Результати “фонового” цитогенетичного обстеження в групах спостереження наведені в табл. 1, де всі групи розташовані в порядку зростання радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту — сумарної частоти цитогенетичних маркерів опромінення — нестабільних (дицентричні та кільцеві хромосоми) та стабільних (аномальні моноцентрики) хромосомних аберацій. Як видно з наведених даних, за цитогенетичними критеріями найменш обтяженою з експонованих груп виявилася група осіб, яка працювала в 30-км зоні відчуження у 2006–2007 рр. Середньогрупова частота радіогенних маркерів у цій групі дорівнювала контрольному рівню (0,68 та 0,64 на 100 метафаз відповідно). Далі йдуть групи осіб, які перехворіли на ГПХ, та ліквідаторів наслідків Чорнобильської аварії, в яких навіть у віддалені строки після опромінення спостерігали підвищені частоти як залишкових (неелімінованих) нестабільних хромосомних маркерів радіаційної дії, так і первинних радіаційно-індукованих стабільних хромосомних аберацій. Максимальний цитогенетичний ефект, який перевищував такий навіть у реконвалесцентів ГПХ, спостерігали в групі працівників сільського господарства, але нечисленність цієї групи (3 особи) може обумовити випадковість одержаних результатів.

На завершальному етапі досліджень особи з усіх груп спостереження були протестовані за допомогою “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay” на індивідуальну чутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові до мутагенного навантаження та її можливої модифікації опроміненням різної інтенсивності. Результати такого тестування наведені в графічному вигляді на рис. 1, на якому наочно спостерігається як широке міжіндивідуальне варіювання цитогенетичного ефекту при дії блеоміцину в обох використаних концентраціях, так і відсутність позитивної кореляції поміж фоновими та індукованими частотами хромосомних аберацій.

Визначення осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, проводили аналогічно виявленню індивідів з підвищеною чутливістю до дії іонізуючої радіації [11] обчисленням ко-

Таблиця 1. Порівняння середньогрупових результатів “фонового” цитогенетичного обстеження осіб, які відрізнялися за інтенсивністю опромінення

Група	Сумарна частота абераційних клітин, %	Сумарна частота хромосомних аберацій, на 100 клітин	Аберації хромосомного типу, на 100 клітин					сума
			парні фрагменти	дицентрики	центричні кільця	аномальні моноцентрики	ацентричні кільця	
Група порівняння [10]	1,12 ± 0,19	1,23 ± 0,20	0,39	0,11	0,00	0,11	0,03	0,64
Працівники 30-км зони відчуження	1,62 ± 0,16	1,70 ± 0,17	0,53	0,00	0,00	0,07	0,08	0,68
Ліквідатори наслідків аварії на ЧАЕС	3,10 ± 0,27	3,31 ± 0,28	1,12	0,21	0,10	0,17	0,12	1,72
Реконвалесценти ГПХ	2,96 ± 0,21	3,33 ± 0,22	0,92	0,32	0,09	0,48	0,13	1,93
Механізатори сільського господарства, які мешкали та працювали на територіях, забруднених радіонуклідами	5,17 ± 0,78	6,17 ± 0,85	1,67	0,83	0,67	0,67	0,17	4,00

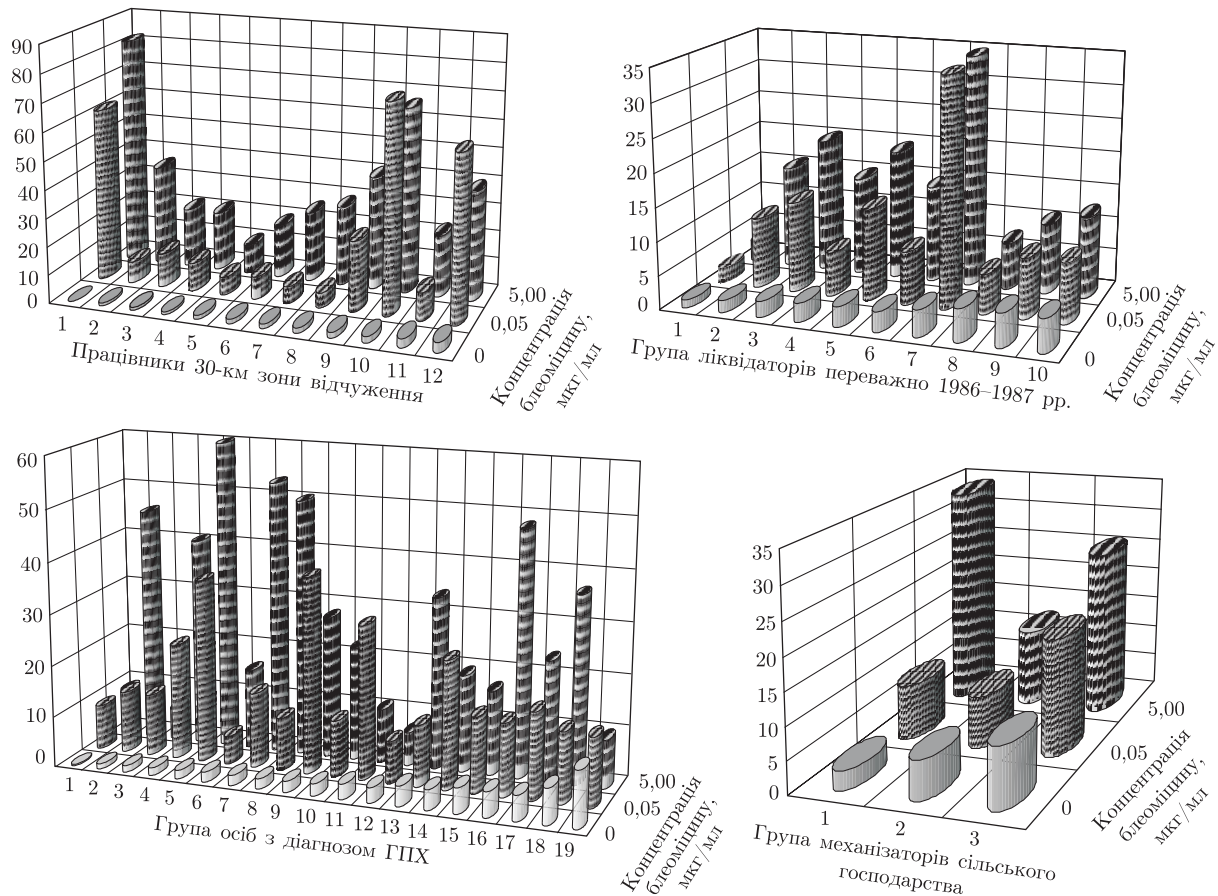


Рис. 1. Порівняння індивідуальних результатів цитогенетичного обстеження у осіб, що постраждали від дії факторів Чорнобильської аварії

ефіцієнта прихованої хромосомної нестабільності ( $K_{ПХН}$ ) за спрощеною нами формулою

$$K_{ПХН} = \frac{M_{ПХН}}{M},$$

де  $M_{ПХН}$  — індивідуальні значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеомицину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл;  $M$  — середньогрупові значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеомицину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл. Прийняли, що для гіперчутливих осіб цитогенетичний ефект, індукований блеомицином, перевищує середньогруповий рівень хромосомних аберацій і тому значення  $K_{ПХН}$  в них завжди буде  $>1$ .

Максимальний відсоток осіб з прихованою хромосомною нестабільністю (11 серед 19 обстежених, що становить 57,9%) виявили в групі реконвалесцентів ГПХ, що, виходячи з їх анамнезу, може бути обумовлено дією високих доз опромінення. В інших групах частота індивідів, гіперчутливих до тестуючої кластогенної дії блеомицину, була практично однаковою і не перевищувала 33,3%.

При порівнянні міжгрупової чутливості до кластогенної дії блеомицину до уваги брали частку вияву осіб, гіперчутливих до дії блеомицину, та додаток до фонові частоти хромо-

Таблиця 2. Порівняння середньогрупових результатів тестування обстежених осіб за допомогою “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay”

Обстежені групи	Гіперчутливі особи, %	Додаток до фонові частоти аберацій, на 100 клітин	
		0,05 мкг/мл	5,00 мкг/мл
Група порівняння [10]	33,3	9,14	14,31
Працівники 30-км зони відчуження	33,3	22,00	32,34
Ліквідатори наслідків аварії на ЧАЕС	30,0	7,95	11,79
Реконвалесценти ГПХ	57,9	13,47	24,71

сомних аберацій (надспонтанний рівень) у кожній з обстежених груп, які були розподілені, як і в табл. 1, залежно від частоти цитогенетичних маркерів опромінення. Результати такого порівняння наведені в табл. 2. Як видно з наведених даних, вірогідну відмінність частки вияву осіб з прихованою хромосомною нестабільністю спостерігали тільки в групі реконвалесцентів ГПХ; в інших обстежених групах відсоток гіперчутливих індивідів не відрізнявся від такого в контрольній групі. Разом з тим максимальний додаток до середньогрупової частоти аберацій хромосом (22,00 та 32,34 на 100 метафаз при концентраціях блеомицину 0,05 та 5,00 мкг/мл відповідно) встановлено у працівників 30-км зони відчуження. У цій же групі особливо яскраво виявилася відсутність позитивної кореляції між фоновими та індуктованими частотами хромосомних аберацій.

Отримані результати дозволяють припустити реальність модифікації генетично зумовленої чутливості хромосом соматичних клітин людини до мутагенного навантаження внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.

1. Adema A., Closs J., Verheijen R. et al. Comparison of bleomycin and radiation in G<sub>2</sub> assay of chromatid breaks // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – 79, No 8. – P. 655–661.
2. Szekely G., Remenar E., Rafsler M. et al. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? // Mutagenesis. – 2003. – 18, No 1. – P. 59–63.
3. Spitz M. Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility // Cancer Detect. and Prevention. – 2005. – 19, No 1. – P. 35.
4. Zajaczek S., Krzanowska-Michalska G., Pikula E. et al. Bleomycin test sensitivity in healthy children // Abstracts of 4<sup>th</sup> Europ. Cytogenetics Conf., Bologna. – 2003. – P. 43.
5. Tuimala J., Szekely G., Gundy Sh. et al. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity // Mutagenesis. – 2006. – 21, No 4. – P. 261–264.
6. Xifeng W. U., Spitz M. R., Amos Ch. et al. Mutagen sensitivity has high heritability: Evidence from a twin study // Cancer Res. – 2006. – 66, No 12. – P. 5993–5996.
7. Lin J., Swan G. E., Shields P. G. et al. Mutagen Sensitivity and Genetic Variants in Nucleotide Excision Repair Pathway: Genotype-Phenotype Correlation // Cancer Res. – 2007. – 67, No 4. – P. 3493–3495.
8. Maffei R., Carbone F., Angelini S. et al. Micronuclei frequency induced by bleomycin in human peripheral lymphocytes: Correlating BLHX polymorphism with mutagen sensitivity // Mutat. Res. / Fund. Molec. Mech. of Mutag. – 2008. – 639, Iss. 1–2. – P. 20–26.
9. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Цитогенетичний спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тесту G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay / Метод. рекомендації. – Київ, 2008. – 23 с.
10. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Прихована хромосомна нестабільність, виявлена при тестуючій мутагенній дії блеомицину *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові контрольних донорів // Доп. НАН України. – 2008. – № 8. – С. 184–188.
11. Дьоміна Е. А., Дружина М. О., Рябченко Н. М. Індивідуальна радіочутливість людини / ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – Київ: Логос, 2006. – 126 с.

Державна установа “Науковий центр радіаційної медицини”, Київ

Надійшло до редакції 20.02.2009

**Determination of hidden chromosome instability in persons suffered from the action of factors of the Chernobyl accident by the modified “G<sub>2</sub> bleomycin sensitivity assay”**

*With the help of the modified “G<sub>2</sub>-bleomycin sensitivity assay”, the voluntary investigation of hidden chromosome instability in 53 persons with different radiation exposures had been fulfilled. In all examined groups, the individual levels of chromosome injuries under identical bleomycin exposure varied in a wide range and didn't depend on their initial values in intact cultures. Among control donors and individuals with low radiation exposure, ~33% hypersensitive persons had been identified that can be considered as a genetically caused phenomenon. In patients recovered from acute radiation, 57.9% persons expressed the hidden chromosome instability. The data obtained allow us to assume that high doses of ionizing radiation can modify the inherited susceptibility of human chromosomes to a mutagen exposure.*