



УДК 576.312.32/38;612.014.482

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

Тривалість зберігання прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини при професійному контакті з іонізуючою радіацією

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Шляхом сумісного використання тестів “G₂-bleomycin sensitivity assay” та двотермінового (48 і 100 год) культивування лімфоцитів периферичної крові проведено добровільне цитогенетичне обстеження групи осіб, які мали професійний контакт з іонізуючою радіацією. Порівняння отриманих результатів з даними аналогічного обстеження неекспонованої групи показало принципові розбіжності між групами в маніфестації та динаміці прихованої хромосомної нестабільності (ПХН) з плином часу, показники якої були вірогідно вищими в професійній групі. Встановлено можливість персистенції радіаційно асоційованої ПХН в послідовних генераціях соматичних клітин людини із значними міжіндивідуальними відмінностями.

Ключові слова: іонізуюча радіація, блеоміцин, тестуюча мутагенна дія, прихована хромосомна нестабільність, персистенція цитогенетичного ефекту.

Соматична патологія (стохастична та мультифакторна), яка реалізується у людини в різні строки після дії іонізуючого випромінювання, може бути спричинена не лише прямим радіаційним ушкодженням клітин-мішеней, але й радіаційно-індукованими немішеневими ефектами, до яких належить одна із форм нестабільності геному — прихована хромосомна нестабільність (ПХН) — генетично зумовлена гіперчутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до дії інших мутагенів — *in vivo* та *in vitro* [1, 2].

Враховуючи актуальність оцінки можливого внеску ПХН в реалізацію віддалених медичних наслідків Чорнобильської аварії (зокрема, онкопатології), ми провели дослідження цього феномену у чорнобильських контингентів пріоритетного спостереження [3–6]. За ре-

зультатами досліджень встановлено можливість радіаційної модифікації генетично детермінованої індивідуальної чутливості хромосом соматичних клітин людини до мутагенного навантаження та існування асоціації між радіаційною гіперчутливістю і реалізацією онкологічної патології в опромінених осіб.

Метою наших подальших розробок було порівняльне дослідження персистенції генетично зумовленої та радіаційно асоційованої ПХН в послідовних мітозах лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* та її здатності передаватись наступним поколінням клітин. Результати дослідження персистенції генетично детермінованої ПХН у практично здорових волонтерів, які заперечували свідомий контакт зі знічаними чи потенційними мутагенними чинниками (інтактна група порівняння), викладені нами в попередній публікації [7].

У даній роботі наведені матеріали щодо особливостей персистенції ПХН в лімфоцитах периферичної крові осіб, які мали професійний контакт з іонізуючим випромінюванням під час заходів із перетворення об'єкта “Укриття” ДСП “Чорнобильська АЕС” на екологічно безпечну систему та працювали в умовах суворого радіологічного контролю.

Для добровільного цитогенетичного обстеження сформували так звану професійну групу, до якої включили 15 чоловіків віком від 19 до 59 років (середній вік $39,1 \pm 0,4$, медіана 40 років), індивідуальні дози опромінення яких коливались в межах 0,05–1,73 мЗв. Усі особи були залучені до цитогенетичного обстеження за умов поінформованої згоди.

У обстежених осіб визначали фонові та індуковані блеоміцином *in vitro* частоти хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові при стандартному коротко- (48 год) та довгостроковому (100 год) культивуванні лімфоцитів периферичної крові — переважно в першій та третій клітинній генерації відповідно.

Умови культивування лімфоцитів, тестуюче мутагенне навантаження культур лімфоцитів блеоміцином *in vitro*, принципи проведення цитогенетичного аналізу, визначення осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, шляхом обчислення коефіцієнта прихованої хромосомної нестабільності ($K_{ПХН}$), статистична обробка отриманих даних відповідали таким, що були наведені в наших попередніх публікаціях [3–6].

Кількість метафаз, проаналізованих від одного обстеженого в кожному з варіантів експерименту, коливалася від 200 до 500; загалом проаналізували 24034 метафази, з яких 12243 — без мутагенного навантаження, 11791 — при дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл.

Результати цитогенетичного обстеження професійної групи наведені в табл. 1, 2 порівняно з такими, що одержані при попередньому аналогічному обстеженні неекспонованої групи [7].

Як видно з отриманих даних (табл. 1), при короткостроковому культивуванні лімфоцитів значення фонові частоти цитогенетичних показників у професійній групі майже не відрізнялися від результатів цитогенетичного обстеження неекспонованої групи ($p > 0,01$) і вкладалися в межі коливань середньопопуляційних значень, характерних для спонтанного хромосомного мутагенезу в соматичних клітинах людини [8, 9]. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації хроматидного типу — одиночні фрагменти ($0,94 \pm 0,12$ на 100 метафаз); аберації хромосомного типу були представлені в основному вільними парними фрагментами ($0,36 \pm 0,08$ на 100 метафаз). Середньогрупова частота обмінних аберацій хромосомного типу ($0,02 \pm 0,08$ на 100 метафаз), які вважаються цитогенетичними маркерами опромінення людини, була на порядок нижче значень популяційного контролю, що свідчило про відсутність радіаційного впливу на обстежених осіб в цитогенетично активних дозах.

Зі збільшенням тривалості культивування лімфоцитів, одержаних від осіб із професійної групи, спостерігалось вірогідне ($p < 0,001$) підвищення цитогенетичного ефекту

як у окремих індивідів, так і по групі в цілому за рахунок зростання частоти простих ацентриків — одиночних ($1,37 \pm 0,14$ на 100 метафаз) та парних ($0,62 \pm 0,09$ на 100 метафаз) фрагментів, які вважаються маркерами хромосомної нестабільності. Проте, як і в неекспонованій групі, було виявлено зниження частоти хромосомних аберацій у послідовних мітозах через елімінацію домінуючого типу пошкоджень хромосом — одиночних ацентричних фрагментів, що характерно для динаміки спонтанного хромосомного мутагенезу [8, 9].

Таблиця 1. Порівняння середніх значень фонових цитогенетичних показників в неекспонованій та професійній групах при двостроковому культивуванні лімфоцитів периферичної крові

Цитогенетичні показники	Строк культивування лімфоцитів, год	Неекспонована група ($n = 15$)	Професійна група ($n = 15$)
Середня частота абераційних метафаз, %	48	$1,61 \pm 0,15$	$1,19 \pm 0,15$
	100	$1,48 \pm 0,14$	$2,00 \pm 0,17$
Розкид значень індивідуальної частоти абераційних метафаз, %	48	0,00–2,80	0,40–2,80
	100	0,20–2,80	0,20–3,80
Середня частота аберацій хромосом (на 100 метафаз)	48	$1,71 \pm 0,15$	$1,37 \pm 0,16$
	100	$1,50 \pm 0,14$	$2,16 \pm 0,18$
Розкид значень індивідуальної частоти аберацій хромосом (на 100 метафаз)	48	0,40–2,60	0,50–2,80
	100	0,00–3,00	0,20–3,80
Частота аберацій хроматидного типу (на 100 метафаз)	48	$1,25 \pm 0,13$	$0,94 \pm 0,12$
	100	$1,03 \pm 0,12$	$1,37 \pm 0,14$
Частота аберацій хромосомного типу (на 100 метафаз)	48	$0,44 \pm 0,14$	$0,43 \pm 0,09$
	100	$0,48 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,10$
Частота аберацій на одну абераційну клітину	48	1,06	1,15
	100	1,01	1,08

Таблиця 2. Порівняння середніх значень цитогенетичних показників в неекспонованій та професійній групах при двостроковому культивуванні лімфоцитів периферичної крові після тестуючої дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл

Цитогенетичні показники	Строк культивування лімфоцитів, год	Неекспонована група ($n = 15$)	Професійна група ($n = 15$)	p
Середня частота абераційних метафаз, %	48	$6,02 \pm 0,32$	$7,68 \pm 0,36$	<0,01
	100	$4,14 \pm 0,23$	$5,50 \pm 0,29$	<0,001
Розкид значень індивідуальної частоти абераційних метафаз, %	48	2,80–8,20	5,68–12,17	
	100	1,60–6,40	2,60 — 9,00	
Середня частота аберацій хромосом (на 100 метафаз)	48	$26,50 \pm 0,60$	$30,35 \pm 0,62$	<0,001
	100	$13,12 \pm 0,39$	$21,08 \pm 0,51$	<0,001
Розкид значень індивідуальної частоти аберацій хромосом (на 100 метафаз)	48	3,40–49,00	4,67–58,77	
	100	1,80–30,86	4,12–64,00	
Частота аберацій на одну абераційну клітину	48	4,40	3,95	
	100	3,17	3,83	
Частота аберацій хроматидного типу (на 100 метафаз)	48	$22,20 \pm 0,56$	$22,52 \pm 0,57$	>0,05
	100	$10,88 \pm 0,36$	$17,95 \pm 0,48$	<0,001
Частота аберацій хромосомного типу (на 100 метафаз)	48	$4,30 \pm 0,57$	$7,83 \pm 0,36$	<0,001
	100	$2,25 \pm 0,17$	$3,04 \pm 0,21$	<0,001
Додаток до фонові частоти аберацій хромосом (на 100 метафаз) — надспонтанний рівень	48	24,79	28,98	
	100	11,60	18,81	

Таким чином, професійна та неекспонована групи відрізнялися між собою за динамікою фонового цитогенетичного ефекту при різних строках культивування лімфоцитів.

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота аберантних метафаз при короткостроковому культивуванні лімфоцитів зросла до $7,68 \pm 0,36\%$, а частота аберацій хромосом — до $30,35 \pm 0,62$ на 100 метафаз, що достовірно ($p < 0,001$) відрізнялося від фонових даних на цьому ж терміні фіксації — $1,19 \pm 0,15\%$ та $1,37 \pm 0,16$ на 100 метафаз відповідно (див. табл. 2). Оскільки в усіх випадках майже кожна аберантна метафаза містила більше однієї хромосомної аберації та практично у всіх обстежених осіб зустрічалися мультиаберантні клітини, середня частота аберацій на одну аберантну клітину досягала 3,95. Слід також відзначити, що у більшості обстежених (13 з 15 осіб) з різною частотою (від 0,2 до 2,0 на 100 проаналізованих метафаз) спостерігалися клітини з пульверизацією хромосом. Міжіндивідуальний розкид частоти хромосомних аберацій був значним і становив від $4,67 \pm 0,81$ до $58,77 \pm 2,24$ на 100 метафаз, що свідчить про значну відмінність між різними індивідами за чутливістю хромосом лімфоцитів до кластогенної дії блеоміцину. У професійній групі особливо вирізнялися чотири особи з максимальним індукованим цитогенетичним ефектом ($\sim 59, 54, 46, 42$ аберацій на 100 метафаз) та максимальною “завантаженістю” аберантних клітин пошкодженими хромосомами (~ 7 на одну аберантну метафазу), хоча фонові частота хромосомних аберацій у них не перевищувала верхньої межі популяційного спонтанного рівня. У цих же осіб величини $K_{ПХН}$ перевищували 1 і становили 1,93; 1,77; 1,50; 1,38, що є підтвердженням їхньої підвищеної чутливості до мутагенного впливу. Як у окремих осіб, так і по групі в середньому значно домінували прості ацентрики (в основному — одиночні ацентричні фрагменти), сумарна частота яких ($30,13 \pm 0,60$ на 100 метафаз) вірогідно ($p < 0,001$) перевищувала фонові дані. Рівень обмінних аберацій хроматидного і хромосомного типів практично не змінився і відповідав їхнім спонтанним значенням.

Таким чином, за всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою переважно фрагментацією хромосом, спостерігали значну міжіндивідуальну варіабельність, яка не залежала від величин фонових даних, одержаних в інтактних культурах.

При 100-годинному культивуванні лімфоцитів достовірно ($p < 0,001$) знизився як індукований блеоміцином середньогруповий цитогенетичний ефект ($30,35 \pm 0,62$ та $21,08 \pm 0,51$ аберацій хромосом на 100 клітин у першому та третьому мітозах відповідно), так і середньогруповий додаток до фонового рівня аберацій хромосом ($28,98$ та $18,81$ на 100 метафаз в 48- та 100-годинних культурах відповідно). Зниження середньогрупового цитогенетичного ефекту в послідовних мітозах було зумовлено зменшенням (на 28,4–81,0%) індивідуальної частоти аберацій хромосом (простих ацентриків з домінуванням одиночних фрагментів) у переважній більшості осіб із значними міжіндивідуальними відмінностями, які не залежали від індивідуального рівня хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином у короткострокових культурах. Разом з тим у двох осіб (№№ 5,7) рівень аберацій хромосом (а саме одиночних фрагментів) у третьому клітинному поділі практично не змінився, а у трьох індивідів (№№ 3, 6, 9), які виявляли гіперчутливість до дії блеоміцину при короткостроковому культивуванні лімфоцитів, — різною мірою (на 40,7; 8,1; 7,6% відповідно) збільшився порівняно з таким у першому мітозі. У цих гіперчутливих осіб величини $K_{ПХН}$ перевищували 1 і позитивно корелювали з аналогічними показниками короткострокових культур, що вказує на можливість збереження та навіть зростання ПХН з плином часу. Це може обумовлюватися зниженням інтенсивності репаративних процесів в аберантних клітинах

або гальмуванням їх елімінації при послідовних клітинних поділах. Подібний феномен, але без тестуючої дії блеоміцину, був встановлений при цитогенетичному обстеженні нащадків опромінених батьків [10] та при вивченні радіаційно-індукованого ефекту свідка [11]. В результаті проведених досліджень також було виявлено персистенцію віддаленої хромосомної нестабільності в довгострокових культурах лімфоцитів крові людини, що вказує на здатність соматичних клітин передавати її своїм наступним поколінням.

Таким чином, незважаючи на односпрямованість динаміки індукованого блеоміцином цитогенетичного ефекту з часом по обох групах у середньому (поступова елімінація в послідовних мітозах), базові середньогрупові цитогенетичні показники в професійній групі виявилися достовірно ($p < 0,01 - < 0,001$) вищими, ніж у групі порівняння при обох строках культивування лімфоцитів. Така різниця, яка спостерігалася за середньою частотою хромосомних аберацій у першому мітозі ($26,50 \pm 0,60$ та $30,35 \pm 0,62$ на 100 метафаз у неекспонованій та професійній групах відповідно), ще раз підтверджує встановлений нами раніше модифікуючий вплив іонізуючого випромінювання на стабільність хромосом та їх чутливість до мутагенної дії [4]. Перевищення середнього рівня хромосомних аберацій у третьому мітозі в осіб із професійної групи над таким у групі порівняння ($13,12 \pm 0,39$ та $21,08 \pm 0,51$ на 100 метафаз в неекспонованій та професійній групах відповідно) свідчить про вплив іонізуючого випромінювання на персистенцію прихованої хромосомної нестабільності в послідовних клітинних генераціях.

Отримані дані вказують на мультифакторну природу ПХН — генетично зумовлену та радіаційно асоційовану і можуть бути використані для виявлення осіб, гіперчутливих до дії мутагенних факторів (включаючи іонізуюче випромінювання), а також проведення відповідних профілактичних та лікувальних заходів.

Цитована література

1. Wright E. G. Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation // *Mutat Res.* – 2010. – **687**, No 1–2. – P. 28–33.
2. NOTE (Nontargeted effects of ionizing radiation). Integrated project 2006–2010. [Електрон. ресурс]. – Режим доступу: <http://www.note-ip.org>.
3. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Прихована хромосомна нестабільність, виявлена при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові контрольних донорів // *Допов. НАН України.* – 2008. – № 8. – С. 184–188.
4. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Радіаційно-індукована модифікація чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro* // *Цитология и генетика.* – 2010. – **44**, № 2. – С. 58–64.
5. Пиллинская М. А., Дыбский С. С., Дыбская Е. Б., Швайко Л. И. Радиационно-индуцированная модификация чувствительности хромосом соматических клеток больных раком легких к тестирующему мутагенному действию блеомицина *in vitro* в отдаленные сроки после Чернобыльской аварии // *Цитология и генетика.* – 2012. – **46**, № 6. – С. 36–43.
6. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Швайко Л. І., Сушко В. О. Реалізація прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС, хворих на рак легенів // *Допов. НАН України.* – 2012. – № 8. – С. 166–171.
7. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Швайко Л. І. Результати дослідження персистенції прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові практично здорових волонтерів // *Допов. НАН України.* – 2014. – № 7. – С. 169–175.
8. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катасова Л. Д., Платонова В. И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // *Вестн. РАМН.* – 2001. – № 2. – С. 21–29.
9. Чеботарев А. Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // *Вестн. РАМН.* – 2001. – № 10. – С. 64–69.

10. Пилінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б. та ін. Експресія хромосомної нестабільності у дітей з патологією щитовидної залози, батьки яких потерпіли від дії факторів Чорнобильської аварії // Допов. НАН України. – 2006. – № 7. – С. 183–188.
11. Шеметун О. В., Талан О. О., Пилінська М. А. Дослідження персистенції радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферичної крові людини // Журн. НАМН України. – 2014. – 20, № 1. – С. 121–126.

References

1. Wright E. Mutat Res., 2010, **687**, No 1-2: 28–33.
2. NOTE (Nontargeted effects of ionizing radiation). Integrated project 2006–2010: <http://www.note-ip.org>.
3. Pilinska M. A., Dibskiy S. S., Dibska O. B., Pedan L. R. Dopov. NAN Ukraine, 2008, No 8: 184–188 (in Ukrainian).
4. Pilinska M. A., Dibskiy S. S., Dibska O. B., Pedan L. R. Cytol. and Genet., 2010, **44**, No 2: 58–64 (in Ukrainian).
5. Pilinskaya M. A., Dibskiy S. S., Dibskaya O. B., Shvayko L. I. Cytol. and Genet., 2012, **46**, No 6: 36–43 (in Russian).
6. Pilinska M. A., Dibskiy S. S., Dibska O. B., Shvayko L. I., Sushko V. O. Dopov. NAN Ukraine, 2012, No 8: 166–161 (in Ukrainian).
7. Pilinska M. A., Dibskiy S. S., Dibska O. B., Shvayko L. I. Dopov. NAN Ukraine, 2014, No 7: 169–175 (in Ukrainian).
8. Bochkov N. P., Chebotarev A. N., Katosova L. D., Platonova V. I. Bull. RAMS, 2001, No 2: 21–29 (in Russian).
9. Chebotarev A. N. Bull. RAMS, 2001, No 10: 64–69 (in Russian).
10. Pilinska M. A., Dibskiy S. S., Dibska O. B. et al. Dopov. NAN Ukraine, 2006, No 7: 183–188 (in Ukrainian).
11. Shemetun O. V., Talan O. O., Pilinska M. A. J. NAMS of Ukraine, 2014, **20**, No 1: 121–126 (in Ukrainian).

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 11.02.2015

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

Длительность сохранения скрытой хромосомной нестабильности в лимфоцитах периферической крови человека при профессиональном контакте с ионизирующей радиацией

ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, Киев

Путем совместного использования тестов “G₂-bleomycin sensitivity assay” и двухсрочного (48 и 100 ч) культивирования лимфоцитов периферической крови проведено добровольное цитогенетическое обследование группы лиц, профессионально контактирующих с ионизирующей радиацией. Сравнение полученных результатов с данными аналогичного обследования неэкспонированной группы показало принципиальные различия между группами в манифестации и динамике скрытой хромосомной нестабильности (СХН) с течением времени, показатели которой были достоверно выше в профессиональной группе. Установлена возможность персистенции радиационно ассоциированной СХН в последовательных генерациях соматических клеток человека с существенными межиндивидуальными отличиями.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, блеомицин, тестирующее мутагенное воздействие, скрытая хромосомная нестабильность, персистенция цитогенетического эффекта.

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

Duration of the hidden chromosome instability persistence in peripheral blood lymphocytes of persons occupationally exposed to ionizing radiation

The National Research Centre for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev

With compatible use of tests “G₂-bleomycin sensitivity assay” and two-term (48 and 100 h) cultivation of human peripheral blood lymphocytes, the voluntary cytogenetic examination of persons who have occupational contact with ionizing radiation is carried out. The results are compared with those obtained in a similar observation of the unexposed group. Principal differences between the groups in the manifestation and the dynamics of the hidden chromosome instability (HCI) in time are found. Its indicators were significantly higher in the occupational group. The possibility of the persistence of radiation-associated HCI in successive generations of human somatic cells with significant interindividual differences is established.

Keywords: ionizing radiation, bleomycin, testing mutagenic exposure, hidden chromosome instability, persistence of cytogenetic effect.