



УДК 576.312.32/38;612.014.482

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

Результати дослідження персистенції прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові практично здорових волонтерів

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Для вивчення персистенції прихованої хромосомної нестабільності (ПХН) в соматичних клітинах людини проведено добровільне цитогенетичне обстеження 15 практично здорових чоловіків, які заперечували свідомий контакт з мутагенними чинниками, з використанням тесту “G₂-bleomycin sensitivity assay” при короткотривалому (48 год) та довгостроковому (100 год) культивуванні лімфоцитів периферичної крові. Встановлено, що фонові частота аберацій хромосом в лімфоцитах обстежених осіб відповідала рівню спонтанного соматичного хромосомного мутагенезу та достовірно не відрізнялася при обох строках культивування клітин. При короткотривалій інкубації лімфоцитів з блеоміцином підвищилася середньогрупові частота хромосомних аберацій зі значними міжіндивідуальними коливаннями, які не залежали від фонових цитогенетичних показників. У довгострокових культурах у всіх обстежених осіб вірогідно зменшилася частота хромосомних аберацій відносно показників першого мітозу, завдяки чому знизився не тільки цитогенетичний ефект по групі в середньому, але й середньогруповий додаток до фонового рівня аберацій хромосом, що свідчить про поступову елімінацію аберантних клітин у послідовних мітозах. Інтенсивність елімінації хромосомних порушень істотно варіювала у різних осіб і не залежала як від величин фонового цитогенетичного ефекту в інтактних культурах, так і від індивідуальних рівнів хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином при короткотривалому культивуванні. Одержані результати підтвердили значення генетично зумовлених міжіндивідуальних особливостей щодо індукції та персистенції ПХН в соматичних клітинах людини.

Одним із проявів нестабільності геному людини на цитогенетичному рівні є так звана прихована хромосомна нестабільність (ПХН), яка визначається як генетично зумовлена гіперчутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до дії інших мутагенів — *in vivo* та *in vitro* та розцінюється як схильність до індукції та промоції канцерогенезу [1, 2]. Наші попередні дослідження показали можливість детекції ПХН за індивідуальною чутливістю хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до тестуючої мутагенної дії радіо-міметика блеоміцина (*in vitro*) та ми вперше встановили не тільки реальність модифікації

© М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. І. Швайко, 2014

генетично детермінованої хромосомної стабільності в соматичних клітинах людини внаслідок дії іонізуючого випромінювання (*in vivo*), але й існування асоціації між цим феноменом і реалізацією онкологічної патології у опромінених осіб [3–6].

Разом з тим до теперішнього часу залишається відкритим питання стосовно персистенції радіаційно-модифікованої ПХН (як *in vivo*, так і *in vitro*) та її здатності передаватися наступним поколінням клітин.

Для вивчення тривалості збереження радіаційно-індукованої ПХН в соматичних клітинах людини нами запропоновано модель із використанням двох попередньо удосконалених методів — “G₂-bleomycin sensitivity assay” [7] та двотермінового культивування лімфоцитів периферичної крові [8], що дає можливість оцінити реальність експресії ПХН в соматичних клітинах людини з плином часу.

Як відомо, важливою кількісною характеристикою мутагенезу людини є спонтанний рівень хромосомних аберацій в соматичних клітинах. Тому для оцінки радіоіндукованого цитогенетичного ефекту потрібні вихідні (фонові) дані щодо спонтанного рівня аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові неекспонованих осіб. У цьому напрямку виконано чимало досліджень (спеціальних та при обстеженні контрольних груп) з використанням, в основному, рівномірного фарбування метафазних хромосом та значно рідше — їх диференційного G-забарвлення та методу FISH-WCP, в результаті чого одержані такі дані і встановлено ряд певних закономірностей [9–11]. Зокрема, показано, що при збільшенні строків культивування лімфоцитів відбувається поступова елімінація нестабільних та частини стабільних хромосомних пошкоджень. Проте при оцінюванні частоти хромосомних аберацій небажано використовувати літературні дані, оскільки неможливо встановити загальний єдиний контроль для різноманітних груп через нереальність урахування всього комплексу причин, які можуть впливати на цитогенетичні показники [12]. При цьому слід відзначити, що саме при аналізі малих вибірок, які найчастіше використовуються в більшості цитогенетичних обстежень, може бути випадкове накопичення кількості індивідів з якоюсь неврахованим генотоксичним або “confounding” фактором, який модифікує спонтанну частоту хромосомних аберацій. Тому при кожному цитогенетичному обстеженні опромінених контингентів необхідно мати власні контрольні дані щодо інтенсивності як спонтанного, так і індукованого тестуючим мутагеном навантаженням *in vitro* хромосомного мутагенезу в групі порівняння, особливо при використанні двострокового культивування лімфоцитів.

Враховуючи вищевикладене, ми провели добровільне цитогенетичне обстеження 15 практично здорових чоловіків, мешканців м. Києва, віком від 29 до 54 років (середній вік 40 років), які заперечували свідомий контакт зі знаними або потенційними мутагенами.

У обстежених осіб визначали фонові та індуковані блеоміцином *in vitro* частоти всього спектра хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові при стандартному короткотривалому (48 год) та довготерміновому (100 год) культивуванні лімфоцитів периферичної крові — 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 проаналізованих клітин від кожної з обстежених осіб у кожному із варіантів експеримента коливалася від 300 до 500 метафаз; всього проаналізували 29150 метафаз, з яких 14950 — без мутагенного навантаження, 14200 — при дії блеоміцину.

Як видно з даних, наведених в табл. 1, при обох строках культивування лімфоцитів фоновий цитогенетичний ефект у групі практично здорових волонтерів відповідав як середньопопуляційним показникам, характерним для спонтанного хромосомного мутагенезу [12], так і результатам наших численних цитогенетичних обстежень інших контрольних груп [3–6]. Виявлено тенденцію до деякого зниження частоти хромосомних аберацій у послідовних мітозах, в основному, за рахунок елімінації домінуючого типу спонтанних пошкоджень хромосом — одиночних ацентричних фрагментів. Разом з тим, через низькі значення цих показників неможливо встановити вірогідну різницю між ними в короткотривалих та довгострокових культурах. Слід відзначити, що аналогічні результати були раніше отримані нами при 144-годинному (п'ятий мітоз) культивуванні лімфоцитів контрольної групи дітей з екологічно благополучного регіону при вивченні затриманої хромосомної нестабільності у нащадків опромінених батьків [13], а також О. В. Шеметун при 120-годинному (четвертий мітоз) культивуванні крові практично здорових осіб (як окремому, так і сумісному з лімфоцитами осіб іншої статі) при дослідженні ефекту свідка [14] — частоти аберацій хромосом у довгострокових культурах не мали статистично достовірної різниці з показниками першого мітозу, одержаними при стандартному 48-годинному культивуванні.

Як видно з даних, наведених в табл. 2, при дії блеоміцину середньогрупова частота аберацій хромосом у короткотривалих культурах зросла до $(6,02 \pm 0,32)\%$, а частота аберацій хромосом — до $(26,50 \pm 0,60)$ на 100 метафаз, що достовірно відрізнялося від такої в інтактних культурах на цьому ж терміні фіксації $(1,61 \pm 0,15)\%$ та $(1,71 \pm 0,15)$ на 100 метафаз відповідно. Оскільки в усіх випадках майже кожна абераційна метафаза містила більше однієї аберації, середня частота аберацій на одну абераційну клітину досягала 4,40. Додаток до фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) становив 24,79 на 100 метафаз.

Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій був значним і становив $(3,40 \pm 0,81)$ — $(49,00 \pm 2,24)$ на 100 метафаз, що свідчить про генетично зумовлену відмінність між різними індивідами щодо чутливості хромосом лімфоцитів до дії блеоміцину. Відсоток осіб, гіперчутливих до мутагенної дії блеоміцину, у яких $K_{ПХН}$ перевищував 1, становив 53,3%.

Як у окремих осіб, так і по групі в середньому значно домінували прості аберації, в основному, одиночні ацентричні фрагменти, частота яких вірогідно перевищувала вихідні дані,

Таблиця 1. Фонові цитогенетичні показники у практично здорових волонтерів при двостроковому культивуванні лімфоцитів периферичної крові (середньогрупові дані)

Цитогенетичні показники	Строк культивування 48 год	Строк культивування 100 год
Частота абераційних метафаз, %	$1,61 \pm 0,15$	$1,48 \pm 0,14$
Розкид індивідуальних частот абераційних метафаз, %	0,00–2,60	0,20–2,80
Частота аберацій хромосом (на 100 метафаз)	$1,71 \pm 0,15$	$1,50 \pm 0,14$
Розкид індивідуальних частот аберацій хромосом (на 100 метафаз)	0,40–2,60	0,00–3,00
Частота аберацій хроматидного типу (на 100 метафаз)	$1,26 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,12$
Частота аберацій хромосомного типу (на 100 метафаз)	$0,44 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,08$
Частота аберацій на одну абераційну метафазу	1,06	1,01

Таблиця 2. Цитогенетичний ефект у практично здорових волонтерів при короткотривалому (48 год) та довгостроковому (100 год) культивуванні лімфоцитів периферичної крові з блесміціном в концентрації 0,05 мкг/мл

$M \pm m$	Аберантні клітини, %	Хромосомні аберації, на 100 клітин	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин									
			хроматидного типу			хромосомного типу						
			Одиночні фрагменти	Обміни	Сума	Парні фрагменти	Дисцентрики	Центричні кільця	Аномальні моноцентрики	Ацентричні кільця	Сума	
			Строк культивування 48 год									
M	6,02	26,50	22,20	0,00	22,20	4,19	0,02	0,00	0,09	0,00	4,30	
m	0,32	0,60	0,56	0,00	0,56	0,27	0,02	0,00	0,04	0,00	0,27	
Строк культивування 100 год												
M	4,14	13,12	10,87	0,01	10,88	2,05	0,07	0,04	0,04	0,05	2,25	
m	0,23	0,39	0,36	0,01	0,36	0,16	0,03	0,02	0,02	0,03	0,17	
p	<0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	

що характерно для кластогенної дії блеоміцину. Рівні обмінних аберацій хроматидного і хромосомного типів практично не змінювалися і відповідали їх спонтанним значенням.

За всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою, переважно, фрагментацією хромосом, спостерігали певну міжіндивідуальну варіабільність, яка не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах.

При довгостроковому культивуванні лімфоцитів у всіх обстежених осіб вірогідно зменшилася частота хромосомних аберацій, завдяки чому в довготермінових культурах на 49,5% знизився не тільки індукований блеоміцином цитогенетичний ефект по групі в середньому (26,50 та 13,12 аберацій на 100 клітин в 48- та 100-годинних культурах відповідно), але й середньогруповий додаток до фонового рівня аберацій хромосом (24,79 та 11,60 на 100 метафаз в 48- та 100-годинних культурах відповідно). Відсоток осіб із ПХН, яка виявлялася в довгострокових культурах, становив 46,7% і в індивідуальному сенсі не завжди позитивно корелював з встановленим при короткотривалому культивуванні.

Зниження цитогенетичного ефекту в послідовних мітозах було зумовлено переважно зменшенням частоти індукованих блеоміцином одиночних фрагментів (22,20 та 10,87 на 100 клітин по групі в середньому відповідно), швидкість елімінації яких значно варіювала у різних індивідів.

Зі збільшенням терміну культивування лімфоцитів достовірно знизилася й середньогрупова сумарна частота аберацій хромосомного типу (4,30 та 2,25 на 100 метафаз в 48- та 100-годинних культурах відповідно) — за рахунок вільних парних фрагментів (4,19 та 2,05 на 100 метафаз в 48- та 100-годинних культурах відповідно). Щодо обмінних аберацій хромосомного типу (дицентричні та кільцеві хромосоми, аномальні моноцентрики), то, хоча вони зустрічалися в окремих осіб при обох термінах культивування, їх індивідуальні й, тим більше, середньогрупові частоти відповідали низьким рівням спонтанного мутагенезу, що не дозволяє оцінити ефективність їх елімінації *in vitro* з часом.

Підкреслимо, що інтенсивність елімінації хромосомних порушень з плином часу значно варіювала у різних осіб (індивідуальні частоти аберацій хромосом у третьому мітозі зменшилися на 12,5 — 84,8% порівняно з такою в першому мітозі) і не залежала як від величин фонового цитогенетичного ефекту в інтактних культурах, так і від індивідуальних рівнів хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином у короткотермінових культурах.

Одержані результати підтверджують значення генетично зумовлених міжіндивідуальних особливостей індукції та персистенції ПХН в соматичних клітинах людини, що слід враховувати при необхідності виявлення осіб, гіперчутливих до дії мутагенів.

1. Spitz M. Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility // Cancer Detect. Prev. — 2005. — 19, No 1. — P. 35.
2. Atkinson M. Individual sensitivity [Електрон. ресурс] / Режим доступу: <http://www.nea.fr/html/rp/helsinki08/presentations>.
3. 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 // Доп. 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. Пилинская 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 // Там же. — 2012. — № 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 ЧАЕС, хворих на рак легенів // Доп. НАН України. – 2012. – № 10. – С. 156–161.
7. Патент на корисну модель № 64932. – UA, 8 МПК А 61 В. Спосіб діагностики прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові людини / Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б. Заявник – ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”. – № u201104515; Заявл. 13.04.2011, опубл. 25.11.2011. Бюл. № 109. – 2011 р.
8. Патент на корисну модель № 15062. – UA, МПК (2006) G01N 33/48/C12Q 1/68. Спосіб виявлення хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові нащадків опромінених людей / Пілінська М. А., Дибський С. С.; Заявник – ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”. – № u 200511589; Заявл. 06.12.2005, опубл. 15.06.2006. Бюл. № 9. – 2006 р.
9. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катосова 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.
10. Пілінська М. А., Дибський С. С. Спонтанний рівень аберацій хромосом, встановлений в лімфоцитах периферичної крові осіб різного віку за допомогою методу FISH // Цитология и генетика. – 2004. – 40, № 4. – С. 61–66.
11. Пилинская М. А., Дыбский С. С., Дыбская Е. Б. и др. Уровень спонтанных хромосомных aberrаций у детей из экологически чистого региона Украины, установленный при цитогенетическом анализе равномерно и дифференциально окрашенных метафазных хромосом // Там же. – 2004. – 40, № 5. – С. 23–28.
12. Чеботарев А. Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // Вестн. РАМН. – 2001. – № 10. – С. 64–69.
13. Пілінська М. А., Дибський С. С., Дибська О. Б., Педан Л. Р. Виявлення хромосомної нестабільності у нащадків батьків, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи, за допомогою двотермінового культивування лімфоцитів периферичної крові // Цитология и генетика. – 2005. – 39, № 4. – С. 32–40.
14. Шеметун О. В., Талан О. О., Пілінська М. А. Проблема стабільності хромосом людини при дії іонізуючого випромінювання у зв’язку з ефектом свідка // Матер. XIII конгресу світової федерації лікарських товариств, 30 вересня – 03 жовтня 2010, Львів. – Львів; Київ; Чикаго, 2010. – С. 699.

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

Надійшло до редакції 26.12.2013

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

Результаты исследования персистенции скрытой хромосомной нестабильности в лимфоцитах периферической крови практически здоровых волонтеров

Для изучения персистенции скрытой хромосомной нестабильности (СХН) в соматических клетках человека проведено добровольное цитогенетическое обследование 15 практически здоровых мужчин, отрицающих сознательный контакт с мутагенными факторами, с использованием теста “G₂-bleomycin sensitivity assay” при кратковременном (48 час) и долгосрочном (100 час) культивировании лимфоцитов периферической крови. Установлено, что фоновая частота aberrаций хромосом в лимфоцитах обследованных лиц соответствовала уровню спонтанного соматического хромосомного мутагенеза и достоверно не отличалась при обоих сроках культивирования клеток. При кратковременной инкубации лимфоцитов с блеомицином повысилась среднегрупповая частота хромосомных aberrаций со значительными межиндивидуальными колебаниями, которые не зависели от фоновых цитогенетических показателей. В долгосрочных культурах у всех обследованных лиц достоверно снизились частоты хромосомных aberrаций относительно показателей первого митоза, благодаря чему по группе в среднем уменьшился надфоновый уровень aberrаций

хромосом, что свидетельствует о постепенной элиминации aberrантных клеток в последовательных митозах. Интенсивность элиминации хромосомных нарушений существенно варьировала у разных лиц и не зависела как от величин фонового цитогенетического эффекта в интактных культурах, так и от индивидуальных уровней хромосомных aberrаций, индуцированных блеомицином при кратковременном культивировании. Полученные данные подтвердили значение генетически детерминированных межиндивидуальных особенностей для индукции и персистенции CXH в соматических клетках человека.

M. A. Pilinskaya, S. S. Dibskiy, Ye. B. Dibskaya, L. I. Shvaiko

The results of studies of hidden chromosome instability persistence in peripheral blood lymphocytes of practically healthy volunteers

The hidden chromosome instability (HCI) persistence in somatic human cells, the voluntary cytogenetic examination of 15 healthy males, who denied contact with mutagenic factors, in short- and long-term cultures of peripheral blood lymphocytes (during 48 and 100 hours, respectively) using "G₂-bleomycin sensitivity assay" has been conducted. The background frequency of chromosome aberrations under the both terms of cultivation corresponded to the level of spontaneous somatic chromosome mutagenesis and did not differ significantly in terms of both cell cultures. Under the short-term incubation of lymphocytes with bleomycin, the mean-group frequency of chromosome aberrations essentially increased with considerable interindividual fluctuations that are independent of the background cytogenetic parameters. In all long-term exposed cultures, the frequency of chromosome aberrations decreased significantly in comparison with the first mitosis data, whereby not only the mean-group cytogenetic effect decreased, but the above spontaneous cytogenetic effect as well, indicating the gradual elimination of aberrant cells in successive mitosis. The intensity of the elimination of chromosome abnormalities varied considerably in different individuals and did not depend on the values of the background cytogenetic effect in intact cultures and on the individual levels of chromosome aberrations induced by bleomycin in short-term exposed cultures. The data confirmed the importance of genetically determined interindividual peculiarities for the induction and the persistence of HCI in somatic human cells.