



УДК 576.312.32/38;612.014.482

© 2008

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

**Прихована хромосомна нестабільність, виявлена  
при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro*  
в лімфоцитах периферичної крові контрольних донорів**

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

*A model system for the investigation of a hidden chromosome instability in somatic human cells by means of bleomycin testing mutagenic exposure in vitro is elaborated. Optimal terms of the treatment by bleomycin of human peripheral blood lymphocytes culture (late post-synthetic G<sub>2</sub> phase of mitotic cycle) as well as optimal concentrations of bleomycin (0.05 and 5.0 µg/ml) for the evaluation of human chromosomes sensitivity to mutagenic exposure in vitro are suggested. It is shown that the main criterion of chromosomes sensitivity to bleomycin exposure must be the total frequency of chromosome aberrations (but not aberrant metaphases). With the help of modifying “G<sub>2</sub>-bleomycin sensitivity assay”, the investigation of hidden chromosomes instability in 9 healthy donors is fulfilled. Three hypersensitive persons had been identified that can be considered as the genetically caused phenomenon.*

У віддалені строки після Чорнобильської аварії провідним фактором у реалізації стохастичних і деяких нестохастичних медичних наслідків променевого ураження людини є радіаційно-індукована нестабільність геному [1, 2]. На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному відіграє прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи абераційному каріотипі, яка виявляється у підвищенні чутливості хромосом соматичних клітин людини до дії інших мутагенів — *in vivo* та *in vitro*.

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності використовуються так звані мутагени-провокатори — в основному іонізуюче випромінювання та радіоміметик блеоміцин, якими обробляється культура лімфоцитів периферичної крові людини на ранній чи пізній постсинтетичній стадії мітотичного циклу (G<sub>2</sub>-sensitivity assay) [3–5]. При порівнянні чутливості хромосом лімфобластоїдних клітин, одержаних від онкологічних пацієнтів та контрольних донорів, до мутагенної дії іонізуючого випромінювання та блеоміцину виявлена позитивна кореляція поміж цитогенетичними ефектами, індукованими обома мутагенами-провокаторами, на основі чого рекомендовано використовувати блеоміцин як альтернативу опроміненню [5].

Тести визначення індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії опромінення чи блеоміцину одержали найбільше поширення при обстеженні онкологічних пацієнтів, переважно для виявлення гіперчутливих осіб, уразливих щодо виникнення та розвитку злоякісних новоутворень різної локалізації [6, 7]. Нами при обстеженні чорнобильських контингентів перевірялась чутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові опромінених осіб до дії гамма-радіації та модельного мутагену диматифу на G<sub>1</sub> стадії мітотичного циклу [8]. У результаті проведених досліджень встановлено як реальність радіоіндукованої зміни стабільності геному соматичних клітин людини, так і необхідність подальшого удосконалення і стандартизації моделі для її виявлення.

Враховуючи масштабність медичних наслідків Чорнобильської катастрофи (включаючи онкопатологію) та беручи до уваги попередні наукові доробки, метою нашого дослідження було визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини.

Оскільки на сьогодні не існує уніфікованої тест-системи для оцінки індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії блеоміцину, різні дослідники використовують блеоміцин як мутаген-провокатор у широкому діапазоні концентрацій, що утруднює порівняння одержаних результатів.

Враховуючи вищезазначене, завданням першого етапу наших досліджень було відпрацювання модельної тест-системи для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові контрольних (умовно здорових) донорів.

Для цитогенетичного аналізу цілну кров (~ 3 мл від кожної особи) культивували за напівмікрометодом у нашій модифікації [8].

При постановці експериментів використовували гідрохлорид блеоміцину для ін'єкцій (Bleocin, BLM, Nippon Kayaku Co. LTD). Базовий розчин та необхідні розведення готували за допомогою стерильного 0,9% розчину хлористого натрію. Блеоміцин додавали до культури лімфоцитів через 48 год після початку інкубації, тобто обробляли культуру *in vitro* на пізній постсинтетичній (G<sub>2</sub>) стадії мітотичного циклу.

Цитогенетичний аналіз проводили “всліпу”, на рівномірно забарвлених зашифрованих препаратах метафазних хромосом під мікроскопами зі збільшенням ×1000. Кількість проаналізованих метафаз для кожного з варіантів залежно від мітотичного індексу культури коливалась від 50 до 500 і становила в середньому 200 на варіант, що відповідало вимогам, необхідним для дослідження цитогенетичного ефекту хімічних сполук у культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* [9]. Усього проаналізували 8875 метафаз.

Для оцінки стабільності хромосомного апарату враховували всі аберації хроматидного та хромосомного типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно забарвлених препаратах метафазних хромосом [9].

Спочатку нами було апробовано цитогенетичну дію чотирьох найчастіше застосовуваних концентрацій блеоміцину — 0,05; 5,00; 50,00; 500,00 мкг/мл, у культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від семи умовно здорових донорів (усі чоловіки) середнього віку. Кожну концентрацію тестували у двох-трьох повтореннях.

При дії блеоміцину *in vitro* спостерігали дозозалежний цитогенетичний ефект — частоти аберацій метафаз та хромосомних аберацій зростали з підвищенням концентрації препарату і коливались від 4,50 до 48,00% та від 5,50 до 150,0 на 100 метафаз (при мінімальній та максимальній концентрації блеоміцину відповідно), що достовірно ( $p < 0,01$ ) перевищувало аналогічні контрольні показники (1,12% та 1,23 на 100 метафаз відповідно). При всіх концентраціях блеоміцину (навіть при мінімальній — 0,05 мкг/мл) кількість абера-

цій перевищувала кількість аберантних метафаз (тобто частина аберантних клітин містила більше однієї аберації), і при максимальній концентрації (500 мкг/мл) на одну аберантну клітину в середньому припадало 3,61 хромосомних уражень. При концентраціях блеоміцину 50 та 500 мкг/мл спостерігали не тільки значний цитогенетичний ефект (навіть до пульверизації хромосомного матеріалу), але й виражену цитотоксичну дію — прогресуюче зниження мітотичної активності, що значно утруднювало проведення хромосомного аналізу. Пошкодження хромосом були представлені переважно простими абераціями — парними та одиночними ацентричними фрагментами з домінуванням останніх, що характерно для кластогенної дії блеоміцину *in vitro*. Частоти обмінних аберацій не залежали від концентрації препарату і знаходились в межах спонтанних коливань. При порівнянні цитогенетичного ефекту, індукованого блеоміцином в однакових концентраціях у культурах, одержаних від різних донорів, встановили, що за інтегральними цитогенетичними показниками (частоти аберантних клітин та всіх типів аберацій) група була досить гомогенна — донори майже не відрізнялись, але за окремими типами аберацій (співвідношення між одиночними та парними ацентричними фрагментами) спостерігались певні міжіндивідуальні коливання.

За результатами тестування цитогенетичної активності блеоміцину для подальших досліджень було відібрано дві оптимальні концентрації препарату — 0,05 та 5,00 мкг/мл, при яких майже не пригнічувалась мітотична активність культури та достовірно зростала частота хромосомних аберацій без пульверизації хромосомного матеріалу. Оскільки навіть при цих концентраціях блеоміцину підвищувалась “завантаженість” аберантних метафаз хромосомними пошкодженнями (з’являлись мультиаберантні клітини), саме частоту аберацій хромосом (а не аберантних метафаз) вважали основним критерієм чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином.

На відпрацьованій моделі проведено дослідження стабільності хромосом лімфоцитів у контрольній групі — у дев’яти умовно здорових донорів (трьох жінок, шести чоловіків у віці 18–64 роки), які заперечували свідомий контакт з відомими чи потенційними мутагенами.

Індивідуальні частоти хромосомних аберацій при дії блеоміцину в обох концентраціях відображені на рис. 1.

Фонова середньогрупова частота хромосомних аберацій в обстеженій групі становила  $1,23 \pm 0,20$  на 100 клітин, що не відрізнялося від середньопопуляційного рівня — 1,52 на 100 клітин ( $p > 0,01$ ) [8, 9]. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації — одиночні та парні ацентричні фрагменти, співвідношення між їх частотами наближалось до 1 : 1.

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота хромосомних аберацій зросла до  $10,37 \pm 0,66$  на 100 метафаз, що достовірно ( $p < 0,01$ ) відрізнялось від такої в інтактних культурах ( $1,23 \pm 0,20$  на 100 метафаз). Середня частота аберацій на одну аберантну клітину досягала 2,18. Додаток до фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) становив 9,14 на 100 метафаз. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації (одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні, близькому до 1 : 1) — як у окремих осіб, так і по групі в середньому.

За всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою фрагментацією хромосом, спостерігали певну міжіндивідуальну варіабельність, яка не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах (див. рис. 1). Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій становив 3,00–32,00 на 100 метафаз. Серед групи порівняння виділявся донор 5 з максимальним

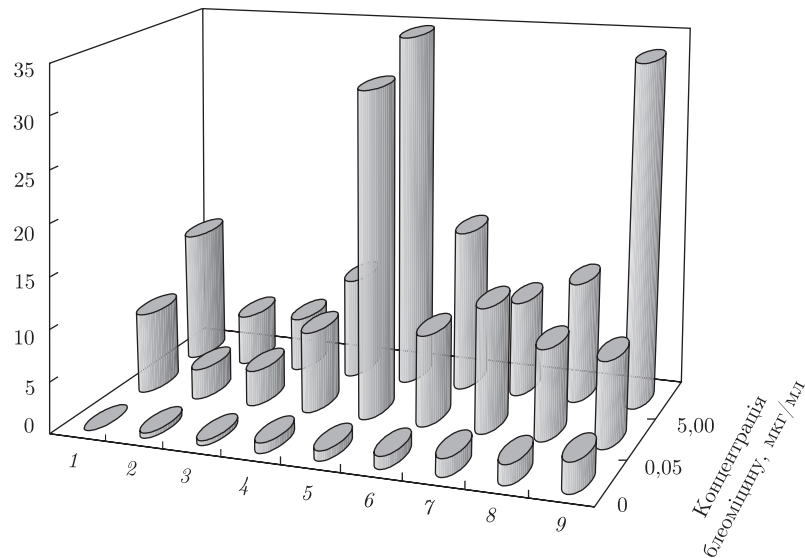


Рис. 1. Частота хромосомних аберацій у контрольній групі донорів (1–9) при тестуючій дії блеоміцину *in vitro* в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл

цитогенетичним ефектом (32,00 аберацій на 100 метафаз) та максимальною “завантаженістю” аберантних клітин пошкодженнями хромосом (4,92 на одну аберантну метафазу), хоча фонові частота хромосомних аберацій у нього становила лише 1,00 на 100 метафаз.

Таким чином, використання блеоміцину як мутагену-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати одну особу з підвищеною чутливістю до мутагенної дії.

При дії блеоміцину в концентрації 5,0 мкг/мл зросли як індивідуальні частоти хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до  $15,54 \pm 0,78$  на 100 метафаз), але середня кількість аберацій в одній аберантній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і становила 1,80, що може бути зумовлено цитотоксичною дією препарату. Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також достовірно підвищилась і по групі в середньому становила 14,31 на 100 метафаз. Основним типом хромосомних пошкоджень залишились прості аберації — одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні, близькому до 1 : 1.

Реакція хромосомного апарату на дію мутагену-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл у осіб обстеженої групи істотно відрізнялась (див. рис. 1). Крім гіперчутливого індивіда 5 (виявленого при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином у концентрації 0,05 мкг/мл), при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл ідентифіковано ще двох осіб із прихованою хромосомною нестабільністю — 6 та 9. Частота хромосомних аберацій донора 5 становила  $35,0 \pm 3,37$ ; у донора 6 —  $16,00 \pm 2,32$ ; у донора 9 —  $34,00 \pm 3,35$  на 100 метафаз, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 5,00 до 12,00 на 100 метафаз.

Таким чином, з використанням модифікованого нами тесту “G<sub>2</sub>-bleomycin sensitivity assay” у контрольній групі донорів виявлено трьох осіб, гіперчутливих до дії мутагену-провокатора, що, виходячи з їх анамнезу (відсутність контакту з відомими чи потенційними мутагенами), можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

1. Мазурик В. К., Михайлов В. Ф. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2001. – **41**, № 35. – С. 272–289.
2. Smith L., Nagar S., Kim G., Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response // Health Phys. – 2003. – **85**, No 1. – P. 23–29.
3. Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer // Cytogen. and Genome Res. – 2004. – **104**, No 1–4. – P. 365–370.
4. Ryabchenko N., Dyomina E. Radiosensitivity of human chromosomes estimated on the basis of the application of the test-system of peripheral blood lymphocytes // Chromosome Res. – 2005. – **13**, Suppl. 1. – P. 3567.
5. 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.
6. Szekely G., Remenar E., Rifsler M. et al. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? // Mutagenesis. – 2003. – **18**, No 1. – P. 59–63.
7. Hsu T. C., Spitz M. K., Schantz S. P. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. – 2002. – **1**. – P. 83–89.
8. Педан Л. Р., Пилінська М. А. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, які постраждали від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* // Доп. НАН України. – 2004. – № 12. – С. 175–179.
9. Хромосомы человека: Атлас / А. Ф. Захаров, В. А. Бенюш, Н. П. Кулешов, Л. И. Барановская. – Москва: Медицина, 1982. – 263 с.

Науковий центр радіаційної медицини  
АМН України, Київ

Надійшло до редакції 28.01.2008