

Е.А. ДЬОМІНА¹, Н.М. РЯБЧЕНКО¹, І.Р. БАРИЛЯК²

¹ Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

² Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВНЕСКУ ПРОЦЕСІВ РЕПАРАЦІЇ У ФОРМУВАННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РАДІОЧУТЛИВОСТІ ЛЮДИНИ НА ХРОМОСОМНОМУ РІВНІ



Наводяться результати власних експериментальних досліджень визначення впливу процесів репарації як ключового фактора у формуванні індивідуальної радіочутливості людини. Показано, що у осіб, гіперчутливих до опромінення, репараційний потенціал знижений вдвічі у порівнянні з контрольною групою.

© Е.А. ДЬОМІНА, Н.М. РЯБЧЕНКО, І.Р. БАРИЛЯК, 2008

Вступ. Згідно з сучасними уявленнями чутливість клітин до дії радіації зумовлена особливостями генетичної структури, антиоксидантної активності, рівнем апоптозу, специфікою клітинного циклу, регуляцією процесів проліферації та загибелі, гетерогенністю популяції, ефективністю роботи системи репарації та іншими факторами. Багатокомпонентна детермінованість радіочутливості істотно ускладнює вибір провідного фактора, що лежить в основі її формування. Радіобіологічні дослідження свідчать, що променеві ефекти визначаються не тільки величиною поглинутої дози іонізуючого випромінювання (ІВ), дією модифікуючих факторів довкілля, а перш за все генетично детермінованою чутливістю індивідуума до ІВ. Кореляція між здатністю геному підтримувати свою стабільність та ризиком виникнення радіогенних злоякісних новоутворень (ЗН) є загально визнаною. В широкомасштабному епідеміологічному дослідженні встановлено, що серед осіб з високим спонтанним рівнем хромосомних аберацій в подальшому рак діагностувався у 2,5 раза частіше в порівнянні з особами із середньопопуляційними показниками [1]. Встановлено кореляцію між підвищеною частотою *in vitro* радіаційно-індукованих хромосомних аберацій і схильністю до розвитку ЗН [2, 3].

Розроблена нами схема досліджень індивідуальної радіочутливості (ІР) здорових донорів на хромосомному рівні лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) в різних стадіях мітотичного циклу [4] водночас дозволила визначити роль процесів репарації у її формуванні. Такий методичний підхід дозволив виявити серед обстежених донорів 12 % осіб з гіперчутливістю до опромінення.

Відповідно до сучасних уявлень провідну роль у формуванні чутливості індивідів до дії радіації відіграють процеси репарації радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК, інтенсивність яких знаходиться під контролем більше 150 відомих сьогодні генів [5]. Репарація ДНК включає складну систему механізмів захисту геному, функція якої полягає у підтримці його інформаційної цілісності. Одним з методів оцінки репараційної здатності клітин людини є G₂-assay, що базується на чутливості ДНК до пошкоджуючої дії радіації та передбачає оцінку числа хроматидних розривів при опроміненні в G₂-періоді мітотичного циклу. Оскільки

ки кожна хроматида складається з подвійного ланцюга молекули ДНК, то розриви хроматид — це не що інше, як нерепаровані двониткові розриви ДНК після опромінення в G₂-періоді, які реєструються в метафазній клітині у вигляді хроматидних делецій. Показано, що радіаційно-індуковані в цій стадії розриви хроматид утворюються в момент конденсації хроматину та формування хроматинового волокна [6].

В даній роботі на хромосомному рівні ЛПК одержано додаткові аргументи на користь провідної ролі процесів репарації у формуванні ІР здорових донорів.

Матеріали і методи. Цитогенетичне дослідження з метою визначення внеску процесів репарації у формуванні ІР виконувалося у вибірці умовно здорових донорів ($n = 103$), яка за результатами G₂-тесту була розподілена на групи з нормальними та підвищеними показниками ІР на хромосомному рівні ЛПК.

Культивування лімфоцитів здійснювали за модифікованим методом Хангерфорда [7]. Клітини інкубували при 37 °С протягом 52 год з наступним аналізом клітин в першому мітозі. Тестуюче γ -опромінення культури здійснювали на терапевтичному апараті «Рокус» в дозі 1,5 Гр при потужності дози 1 Гр/хв на 40-й годині інкубації клітин, що відповідало S-стадії мітотичного циклу, після чого культури лімфоцитів відразу піддавали дії гіпертермії (42 °С, 1 год).

Цитогенетичні препарати аналізували на стадії метафази з елементами каріотипування.

Достовірність відмінностей одержаних цитогенетичних показників між групами оцінювали за допомогою критерію χ^2 .

Результати досліджень та їх обговорення. Раніше нами була сформульована гіпотеза про механізми радіосенсибілізації при додатковій гіпертермічній дії на клітини людини [8]. Ця гіпотеза ґрунтується на тому, що термічна інактивація білків клітини, включаючи білки, що пов'язані з ДНК, а також ферменти репарації, викликає порушення структури нуклеопротейдів і пригнічення процесів репарації радіаційних пошкоджень. В залежності від послідовності термічної та променевої дій внесок даних процесів може бути різний. Так, якщо гіпертермія передуює опроміненню, відбувається

інактивація гістонів та пошкодження структури нуклеопротейдів. У випадку постпроменевої гіпертермії переважна роль, очевидно, належить процесам денатурації (інактивації) ферментів репарації. Тому при взаємному впливові опромінення та підвищеної температури, з одного боку, з'являється ймовірність взаємодії первинних радіаційних та термічних пошкоджень ДНК, а з іншого — порушуються процеси відновлення біоструктур від цих пошкоджень. Виходячи з положень цієї гіпотези, ми запропонували ще один методичний підхід до оцінки внеску процесів репарації у формування ІР людини, який базується на додатковій дії післяпроменевої гіпертермії в S-періоді мітотичного циклу.

По-перше, наші дослідження підтвердили виражену радіорезистентність лімфоцитів людини в період реплікації хромосом (S-період) (рис. 1).

По-друге, були виконані попередні дослідження цитогенетичного ефекту гіпертермії в S-стадії мітотичного циклу (таблиця), виходячи з наступних міркувань. Оскільки в цій стадії мітотичного циклу відбувається активація процесів репарації, то за додаткової термічної дії слід очікувати пригнічення цих процесів і, відповідно, реалізації більшого числа радіаційних пошкоджень.

Показано, що при гамма-опроміненні клітин в S-стадії додаткова постпроменева гіпертермія (42 °С, 1 год) призводить до підвищення

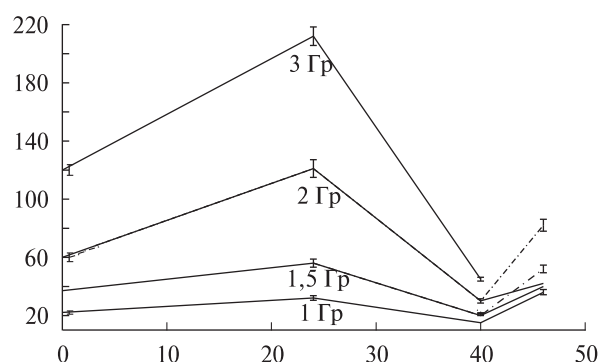


Рис. 1. Кінетика загальної частоти аберацій хромосом у культурі лімфоцитів людини, індукованих γ -опроміненням, протягом клітинного циклу (пунктирні лінії — фіксація на 58-й годині, решта — фіксація на 52-й годині): по вертикалі — загальне число аберацій на 100 метафаз; по горизонталі — стадія циклу, год

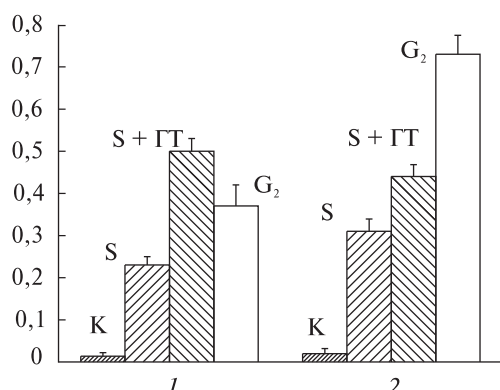


Рис. 2. Цитогенетичні ефекти тестуючого опромінення в дозі 1,5 Гр та гіпертермічної (ГТ) інгібіції ферментів репарації в S-стадії мітотичного циклу ЛПК умовно здорових осіб з різною ІР: по вертикалі – число аберацій хромосом на одну метафазу; по горизонталі – 1 – донори з нормальною радіочутливістю хромосом; 2 – донори з підвищеною радіочутливістю хромосом

сумарного виходу аберацій хромосом (приблизно у 1,5–2 рази) порівняно з дією тільки опромінення (таблиця). Для оцінки впливу гіпертермії ми ввели коефіцієнт теплового посилення променевого ефекту (КТП), який вираховували із співвідношення доз, що викликають однаковий цитогенетичний ефект за формулою

$$\text{КТП} = \frac{D_x}{D_{xt}},$$

де D_x – доза опромінення; D_{xt} – доза опромінення, яка у поєднанні з гіпертермічною дією викликає той самий ефект, що й D_x .

Коефіцієнт термічного посилення ефекту в S-стадії залежить від дози опромінення і в діапазоні 1,0–4,0 Гр дорівнює 2,0–1,7 відповідно.

Одержані таким чином дані та розроблену схему досліджень радіочутливості людини [4] ми взяли за основу при визначенні внеску процесів репарації у формування ІР на хромосомному рівні соматичних клітин людини. Для цього був проведений порівняльний аналіз рівня аберацій хромосом при опроміненні в дозі 1,5 Гр в S-стадії з додатковим термічним пригніченням ферментів репарації (42 °С, 1 год) у лімфоцитах осіб з нормальними (І група) та підвищеними (ІІ група) показниками радіочутливості хромосом за G_2 -тестом (рис. 2).

Встановлено, що частота аберацій хромосом, індукованих в S-стадії культури ЛПК донорів І групи, становила $22,6 \pm 2,0$, тоді як у ІІ групі – $31,0 \pm 2,1$. Додаткова постпроменева гіпертермічна дія в S-стадії мітотичного циклу зумовила підвищення цих показників до середньогрупових значень $50,5 \pm 2,8$ та $44 \pm 1,7$ відповідно. На рис. 2 видно, що найбільший модифікуючий ефект гіпертермії виявляється в групі осіб із середньогруповою радіочутливістю (І група), для яких КТП променевого цитогенетичного ефекту становив 2,2, тоді як в групі більш радіочутливих – 1,4. Це означає, що у осіб, гіперчутливих до дії радіації, процеси репарації недостатньо виражені, що, в свою чергу, зумовило нижчий ефект радіомодифікації у порівнянні з групою осіб з середніми значеннями ІР.

Таблиця 1

Частота аберацій хромосом на 100 клітин при комбінованій дії гамма-опромінення та підвищеної температури на ЛПК людини в S-стадії (40 год інкубації; фіксація 52 год)

Доза	Вивчено метафаз	Число абераційних метафаз, %	Загальна кількість аберацій	Хроматидний тип			Хромосомний тип				
				делеції	ізо-делеції	обміни	фрагменти	ацентричні кільця	аномальні кільця	центричні кільця	дицентрики
42 °С 1 год	200	$4,5 \pm 1,4$	$4,5 \pm 1,4$	4,5	—	—	—	—	—	—	—
1,0 Гр	300	$16,6 \pm 2,1$	$18,2 \pm 2,4$	8,0	3,0	2,0	4,3	0,3	—	0,3	0,3
1,0 Гр + 42 °С	300	$33,0 \pm 2,7$	$41,2 \pm 3,7$	18,0	8,3	2,7	6,6	2,3	0,3	—	3,0
2,0 Гр	200	$30,0 \pm 3,2$	$34,0 \pm 4,1$	19,0	6,0	3,0	3,0	—	—	1,0	2,0
2,0 Гр + 42 °С	200	$45,0 \pm 3,5$	$54,0 \pm 5,2$	22,0	11,0	11,0	1,0	3,0	—	—	6,0
3 Гр	200	$39,5 \pm 3,3$	$49,5 \pm 5,0$	19,5	8,5	15,0	5,0	1,0	—	0,5	—
3,0 Гр + 42 °С	200	$56,0 \pm 3,5$	$84,0 \pm 6,4$	24,0	18,0	20,0	10,0	—	3,0	4,0	5,0
4,0 Гр	100	$49,0 \pm 5,0$	$63,0 \pm 7,9$	17,0	5,0	32,0	6,0	1,0	—	1,0	1,0
4,0 Гр + 42 °С	100	$67,0 \pm 4,7$	$108,0 \pm 10,3$	44,0	12,0	34,0	12,0	5,0	—	—	1,0

Отже, за нашими даними у осіб, гіперчутливих до дії радіаційного чинника, репараційний потенціал знижений майже у два рази в порівнянні з контрольною групою (особи з середньогруповими значеннями радіочутливості). Одержані цитогенетичні дані є додатковим аргументом на користь провідної ролі інтенсивності процесів репарації у формуванні ІР людини.

Висновки. Одержані результати вказують на вирішальну роль процесів репарації, а саме їх пригнічення, у формуванні підвищеної ІР людини. Соматичні клітини осіб з підвищеною радіочутливістю на хромосомному рівні потенційно менш чутливі до дії модифікаторів репаративного синтезу ДНК.

SUMMARY. The results of experimental investigations of the role of DNA repair as the key factor of human individual radiosensitivity formation are presented. It is shown that repair potential of hypersensitive to irradiation individuals is approximately twice lower as compared with the control group.

РЕЗЮМЕ. Представлены результаты собственных экспериментальных исследований влияния процессов репарации как ключевого фактора на формирование индивидуальной радиочувствительности человека. Показано, что у лиц гиперчувствительных к облучению, репарационный потенциал снижен почти вдвое по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hagmar L., Strömberg U., Bonassi S. et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts // *Cancer Res.* — 2004. — **64**. — P. 2258–2263.
2. Darroudi F., Vyas R.C., Vermeulen S., Natarajan A.T. G2 radiosensitivity of cells derived from cancer-prone individuals // *Mutat. Res.* — 1995. — **328**. — P. 83–90.
3. Sanford K.K., Parshad R., Price F.M. et al. Cytogenetic responses to G₂-phase X-irradiation of cells from retinoblastoma patients // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 1996. — **88**. — P. 43–48.
4. Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М. Індивідуальна радіочутливість людини. — К.: Логос, 2006. — 126 с.
5. Wood K.D., Mitchell M., Lindahl T. Human DNA repair genes // *Mutat. Res.* — 2005. — **577**, № 1/2. — P. 275–283.
6. Parshad R., Sanford K.K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition / *Critical Reviews in Oncology // Hematology.* — 2001. — **37**. — P. 87–96.
7. Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М. Оцінка індивідуальної радіочутливості умовно здорових осіб на основі розробленої схеми цитогенетичного обстеження // *Лаб. діагностика.* — 2006. — № 2 (36). — С. 30–34.
8. Гриневич Ю.А., Демина Э.А. Иммуные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоизирующих излучений / Под. ред. А.А. Ярилина. — Київ : Здоров'я, 2006. — 200 с.

Надійшла 26.03.07