

НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В., КЛИМЕНКО С.В., КОВАЛЬ Г.М., ВЕРБИЛЕНКО Р.М., ШКАРУПА В.Н.

*ДУ «Національний Науковий Центр Радіаційної Медицини НАМН України»
Україна, 04050 Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: lneum@bigmir.net*

ОЦІНКА ХРОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ, ЩО ПОСТРАЖДАЛИ ВІД ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

В Україні ризик розвитку онкологічних захворювань неухильно збільшується, що вимагає проведення своєчасних широкомасштабних медико-біологічних досліджень. Існуючи на сьогодні епідеміологічні дослідження, які спрямовані на визначення причини різкого зростання раку пов'язують даний факт з Чорнобильською катастрофою [1, 2]. А численні наукові розробки радіобіологів і генетиків підтверджують значення радіаційно-індукованої дестабілізації хромосомного апарату в злоякісній трансформації клітин людини. Тобто, саме іонізуюча радіація, навіть в «малих дозах», здатна індукувати геномну нестабільність у вигляді різних порушень хромосом і обумовлювати виникнення онкопатології. Крім того, хромосомні порушення, які є важливою характеристикою пухлинної клітини, можуть бути як наслідком, так і причиною розвитку раку. Перші спроби щодо розкриття даного механізму належать голандському генетику Гуго де Фризу, який в 1901 році висловив припущення, що рак виникає в результаті змін у спадковому апараті клітини. Надалі в 1914 році ні-

Матеріали і методи

Для вирішення питань щодо визначення частоти (ХА) у лімфоцитах периферичної крові хворих на РЩЗ було сформовано 3 досліджувані групи.

Перша – основна – включала хворих на РЩЗ, які зазнали дії іонізуючої радіації. Це учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (УЛНА), особи евакуйовані з територій, забруднених радіонуклідами і мешканці територій з підвищеною щільністю радіоактивного забруднення. Вік хворих становив в середньому $53,2 \pm 5,5$ років. Друга – група порівняння складалася з хворих на РЩЗ, які не зазнали радіаційного впливу, тобто не мали професійних контактів з джерелами (ІВ), не мешкали і не були евакуйовані з забруднених радіонуклідами територій, а також протягом трьох місяців до обстеження не проходили діагностичних рентгенологічних процедур. Середній вік групи дорівнював $49,7 \pm 9,3$ років. Третя - контрольна група складалася з практично здорових донорів обох статей віком $47,6 \pm 8,6$ років, що не мають професійних кон-

мецький ембріолог Боварі вперше зазначив, що в основі малігнізації лежать незворотні зміни, що виявляються у вигляді різних порушень числа і структури хромосом в соматичних клітинах. Але, проблемою досліджень в цій галузі є те, що радіаційне опромінення є причиною розвитку лише частини випадків в групах хворих на радіаційно-асоційований рак, тоді як більшість з них має спонтанне походження. Крім того, на людину впливає величезна кількість мутагенних факторів нерадіаційної природи, що також ускладнює виокремлення ефекту іонізуючої радіації.

Представлена робота є продовженням науково-дослідної роботи, яка полягає в визначенні особливості дестабілізації геному соматичних клітин в осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС і захворіли на рак щитоподібної залози (РЩЗ).

Метою цього дослідження було визначити рівень та спектр хромосомних аберацій (ХА) в лімфоцитах периферичної крові хворих на РЩЗ, що зазнали в минулому дії іонізуючого випромінювання (ІВ) унаслідок аварії на ЧАЕС.

Тактів з джерелами ІВ, не мали протягом трьох місяців гострих захворювань і діагностичних рентгенологічних процедур за півроку до обстеження.

Цитогенетичне обстеження онкохворих здійснювалося після того, як вони були прооперовані і ще не отримували хіміо-, радіоїод- та рентгентерапію. При цьому використовувався методу цитогенетичного аналізу.[3], значимість якого обумовлено високою радіочутливістю лімфоцитів крові людини, низьким спонтанним рівнем ХА, наявністю специфічних щодо дії радіації хромосомних перебудов, дозовою залежністю, котра добре вивчена, доступністю та об'єктивністю. Методика приготування цитогенетичних препаратів описана нами в раніше опублікованій роботі .

Під час цитогенетичного аналізу враховували усі структурні ХА хромосомного і хроматидного типів, анеуплоїдії і поліплоїдії. На одне спостереження аналізували до 200 метафаз згідно з рекомендаціями Н.П. Бочкова [4].

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням пакету програм

Результати та обговорення

Проведений цитогенетичний аналіз показав, що в спектрі структурних ХА виявлено хромосомні та хроматидні порушення (парні та одиночні фрагменти), дицентрики, ацентричні кільцеві хромосоми, міжхроматидні обміни. Числові порушення представлені поліплоїдами і анеуплоїдами

Частота аберантних метафаз що включає структурні і числові аберації хромосом (АМ) в лімфоцитах периферичної крові основної групи хворих на РЩЗ, що зазнали дії ІВ достовірно перевищує такий показник в групі порівняння (онкохворі на РЩЗ, що не зазнали в минулому дії ІВ) і достовірно вища ніж в контрольній групі. Виявлено, що у кожної окремої особи основної групи рівень АМ коливався в межах від 3,4 % до 11,2 %. Такий діапазон розбіжностей може бути пояснений ступенем малігнізації та підвищеною індивідуальною радіочутливістю певних людей. У цій групі онкохворих зареєстровані всі форми злоякісних новоутворень ЩЗ – папілярна, фолікулярна і медулярна карциноми. На думку онкогенетиків, саме у хворих на медулярний РЩЗ частіше спостерігається підвищений рівень аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові [5]. У метафазних пластинках лімфоцитів хворих досліджуваної основної групи спостерігалися аберації стабільного (одиночні і парні фрагменти) і нестабільного типу (дицентрики і кільцеві хромосоми) Наявність ацентричних кільцевих хромосом і дицентриків в цій групі і відсутність таких в групі порівняння і контролі, може свідчити про радіогенний характер новоутворення. Важливим є те, що структурні аберації хромосом розглядаються деякими авторами як найбільш вірогідні події, які пов'язані з малігнізацією. На думку ряду дослідників, саме наявність анеуплоїдії та поліплоїдії в метафазних пластинках може сприяти появі нових структурних порушень [6]. Частота анеуплоїдії і поліплоїдії в лімфоцитах хворих в даній групі не відрізнялася від такої ні в групі порівняння, ні в контролі.

Таким чином, дослідження частоти хромосомних аномалій в лімфоцитах периферичної крові хворих на РЩЗ, які в минулому зазнали опромінення в результаті професійної діяльності – УЛНА на ЧАЕС, осіб евакуйованих з радіоактивно забруднених територій і мешканців на забруднених радіацією територіях, дали змогу

Statistica Base Вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм Стьюдента при рівні $p < 0,05$.

констатувати, що частота хромосомних пошкоджень в лімфоцитах їх крові перевищує рівень в групі порівняння (хворі на рак, що не зазнали ІВ) і в контролі, а наявність специфічних маркерів радіаційного впливу (дицентрики, кільцеві центричні і ацентричні хромосоми, аноманомальні моноцентрики) може свідчити про радіогенний характер захворювання.

Стосовно цитогенетичного аналізу лімфоцитів хворих на РЩЗ групи порівняння виявлено, що середньогрупова частота аберантних метафаз складала $3,26 \pm 0,50$ на кожні 100 проаналізованих клітин, відповідає верхній межі середнього популяційного спонтанного рівня аберацій, але суттєво перевищує значення даного показника в групі контролю ($1,62 \pm 0,53$ %). Частота структурних мутацій також достовірно перевищувала контрольний рівень і складала 3,14 %. Аналізуючи частоту хромосомних аберацій в залежності від типу пошкодження, було встановлено, що серед аберацій хроматидного типу в лімфоцитах хворих на РЩЗ переважали одиночні фрагменти, які становили більш половини у спектрі всіх зареєстрованих структурних аберацій, на відміну від контрольної групи, де були тільки аберації хроматидного типу, що налічували майже 92%. На частку структурних аберацій хромосомного типу (парні фрагменти) в досліджуваній групі припадало 33 %. Рідше реєструвалися поліплоїдні і анеуплоїдні клітини. В цілому, порівнюючи частоту хромосомних аберацій в обох групах, слід визначити вірогідне підвищення частоти одиночних фрагментів у хворих на РЩЗ групи порівняння порівняно зі здоровими особами контрольної групи, що показано в таблиці.

Хромосомні аберації нестабільного типу (дицентрики, кільцеві хромосоми), які вважаються маркерами радіаційного впливу не зареєстровано.

Стосовно причин виникнення одиночних фрагментів вважається, що цей вид перебудов може ефективно індукуватися в лімфоцитах периферичної крові хімічними мутагенами, які ушкоджують ДНК на пресинтетичній стадії клітинного циклу. Крім того, виникнення хромосомних перебудов у лімфоцитах периферичної крові в групі порівняння можуть полягати в особливостях патогенезу спонтанного варіанту захворювання.

Таблиця. Частота хромосомних пошкоджень у хворих на РЩЗ та здорових осіб

Групи	Основна	Порівняльна	Контрольна
Проаналізовано метафаз			
Типи аберацій	3000	1250	1200
	(M±m) %	(M±m) %	(M±m) %
Одиночні фрагменти	1,70±0,23	1,91 ± 0,29 *	1,09 ± 0,30
Парні фрагменти	2,40±0,27**	1,09 ± 0,34	0,02 ± 0,02
Дицентрики	1,60±0,22**	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
Міжхроматидні обміни	0,03±0,03	0,14 ± 0,10	0,00 ± 0,00
Кільцеві хромосоми	0,80±0,16*	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,08
Поліплоїдні клітини	0,70±0,11	0,49 ± 0,28	0,00 ± 0,00
Анеуплоїди	0,96±0,18	0,71 ± 0,24	0,79 ± 0,24
Частота хромосомних аберацій	5,71±0,42**	3,14 ± 0,52 *	1,20 ± 0,30
Частота аберантних метафаз	4,67±0,38**	3,26 ± 0,50 *	1,62± 0,30

Примітки: * – достовірність $P < 0,05$ між показниками однієї групи і контролем, ** – достовірність $P < 0,05$ між показниками обох груп і контролем.

Таким чином, хромосомні ушкодження в лімфоцитах периферичної крові хворих на спонтанний РЩЗ статистично достовірно перевищують такі в контрольній групі по показникам числа аберантних метафаз і частоти структурних аберацій, які представлені одиночними фрагментами.

Разом з тим, приймаючи до уваги, що досліджувана вибірка в групі порівняння складалася з невеликої кількості осіб, включала хворих з різними гістологічними формами РЩЗ остаточного висновку по даному дослідженню зробити

наразі неможливо. Тому необхідні подальші дослідження з врахуванням всіх можливих факторів, які можуть впливати на правильну і обґрунтовану інтерпретацію отриманих даних. Адже пухлинний процес супроводжується глибокими змінами в організмі, у зв'язку з чим хворі, зазнають, окрім перенесеного раніше радіаційного опромінення, впливу ендогенних факторів, дія яких може відбиватися на ефективності процесів репарації та, відповідно, на цитогенетичному статусу клітин шляхом підвищеного рівня структурних і числових аберацій.

Висновки

Встановлено, що частота хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові хворих на РЩЗ – ліквідаторів та тих, що проживали і були евакуйовані з радіоактивно забруднених територій, достовірно відрізняється від контролю і перевищує значення верхньої межі середньопопуляційного спонтанного рівня хромосом-

них аберацій. Встановлення підвищеного рівня хромосомних аберацій в лімфоцитах хворих на РЩЗ, що зазнали радіаційного впливу, в порівнянні з таким у хворих на спонтанний РЩЗ, може свідчити, що післярадіаційна хромосомна нестабільність відіграє роль у формуванні радіаційно-асоційованих новоутворень.

Література

1. Берштейн Л.М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза / Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, №1. – С. 1–8.
2. Schlumberger, M.J. Papillary and follicular thyroid carcinoma // New Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 338, №5. – P. 297–306.
3. Хвостунов И.К. Роль стохастических факторов в процессе формирования первичных поврежденных ДНК и хромосомных аберраций при воздействии радиации на соматические клетки млекопитающих *in vivo* и *in vitro*: Автореф. дис. докт. биол. наук: 03.01.01./ Хвостунов Игорь Константинович. – Обнинск, 2011. – 34 с.
4. Бочков, Н.П. Анализ типов аберрантных клеток – необходимый элемент биологической индикации облучения // Мед. радиология. – 1993. – №2. – С. 32–35.
5. Frigyesi A. et al. Power Law Distribution of Chromosome Aberrations in Cancer // Cancer Res. – 2003 – Vol. 63. – P. 7094–7097.
6. Моссэ И.Б. Проблемы оценки генетических эффектов ионизирующей радиации у человека // Техногенна безпека. – 2010. – Т. 116, вип. 103. – С. 4–8.

NEUMERZITSKAYA L.V., KLIMENKO S.W., KOVAL G.M., WERBILENKO R.M.,
V.N. SHKARUPA

*Si «National Scientific Center for Radiation Medicine NAM S of Ukraine»
Ukraine, 04050, Kiev, Melnikov str., 53, e-mail: lneum@bigmir.net*

STUDY OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN THE SOMATIC CELLS OF PATIENTS WITH THYROID CANCER WHO SUFFERED FROM THE CHERNOBYL ACCIDENT

Aims. Research level and spectrum of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of patients with thyroid cancer, which were last ionizing radiation due to the Chernobyl accident. **Methods.** Cytogenetic analysis of human lymphocytes. **Results.** Cytogenetic studies of peripheral blood lymphocytes of patients with thyroid cancer. This group of patients previously exposed to radiation. The frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of patients with higher levels of spontaneous and significantly higher than the control group.

Key words: thyroid cancer, chromosome aberrations, radiation.

РЫМАРЬ С.Е., РАЧКЕВИЧ Н.О., КУЛАЧКО А.В., РУБАН Т.А., КОРДЮМ В.А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН
Украины, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: s.y.rymar@imbg.org.ua
ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН»
Украины, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67*

ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ СНО-K1 КАК ИСТОЧНИК РЕКОМБИНАНТНОГО FGF2 ЧЕЛОВЕКА

Современная регенеративная медицина рассматривает возможность использования рекомбинантных белков (гормонов, цитокинов, факторов крови и др.) для достижения терапевтических эффектов при ряде заболеваний человека (диабет I типа, рак, гемофилия, воспалительные, нейродегенеративные заболевания). Использование рекомбинантных белков не всегда обеспечивает необходимый терапевтический эффект в силу их быстрого клиренса. Альтернативой использованию очищенных рекомбинантных терапевтических белков является трансплантация клеток, которые их продуцируют. Трансплантация алогенного клеточного материала требует интенсивной иммуносупрессии, приводящей к серьезным побочным эффектам, таким, например, как оппортунистические инфекции. Интенсивные исследования, связанные с разработкой подходов к трансплантации клеток, которые могут стать источником терапевтических белков и при этом не быть мишенью для атаки со стороны иммунной системы даже, если клетки ксеногенные, привели к появлению технологии инкапсуляции трансплантируемых клеток.

Инкапсуляция клеток в микрокапсулы из безопасных полупроницаемых материалов, ко-

торые позволяют входить питательным веществам и выходить терапевтическим белкам, защищает клетки от атаки иммунной системы и обеспечивает долговременный терапевтический эффект [1, 2]. Наиболее перспективным материалом для инкапсуляции клеток на сегодня считается альгинатный гель [3]. Источником необходимых терапевтических агентов чаще всего служат генетически модифицированные клетки. Цель данного исследования состояла в том, чтобы получить трансгенную линию СНО-K1, которая продуцирует и секретирует в среду рекомбинантный FGF2 человека, и сравнить продукцию и секрецию рекомбинантного FGF2 трансгенными клетками при культивировании их в монослое и в альгинатных микрокапсулах. Интерес к FGF2 продиктован его широкими биологическими функциями, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, их выживание, адгезию, миграцию, подвижность и апоптоз, а также ангиогенез, развитие сердечно-сосудистой системы, заживление ран, рост злокачественных опухолей [3]. Кроме того он играет важную роль в процессах, связанных с повреждением сердца, почек и кишечника. Эти свойства FGF2 открывают перспективы его использования в терапевтических целях.