

В.А. Вінніков,
В.С. Мазник,
А.В. Щегольков,
О.Е. Ірха

Інститут медичної радіології
ім. С.П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків

Протокол реєстрації результатів цитогенетичного аналізу в довготермінових культурах лімфоцитів людини після радіаційного впливу

Protocol for cytogenetic analysis results
registration in human lymphocyte long-term
cultures after radiation exposure

Цель работы: Разработать оптимизированный протокол регистрации и статистической обработки результатов хромосомного анализа при разных сроках культивирования лимфоцитов крови человека после радиационного воздействия.

Материалы и методы: Классический цитогенетический анализ FPG-окрашенных препаратов 50- и 76-часовых культур лимфоцитов периферической крови 15 больных раком тела матки (РТМ) I–II стадий после дистанционной или сочетанной лучевой терапии (ЛТ); создание компьютерной программы с использованием среды разработки программного обеспечения Inprise Borland C++ Builder 6 и ядра баз данных Borland Database Engine.

Результаты: Предлагается оригинальный детализированный протокол и его компьютерная версия, предназначенные для комплексного анализа спектра цитогенетических повреждений, наблюдаемых в клетках долгосрочной культуры лимфоцитов крови человека после облучения. Протокол основан на учете 30 показателей (различных видов aberrаций хромосом и геномных нарушений) и позволяет проводить расчет частоты и построения по клеточным распределений отдельных видов цитогенетических повреждений или их произвольных комбинаций. Особое внимание уделено статусу хромосомных фрагментов (сопровождение обменных aberrаций, реплицированность). Предусмотрена возможность выбора способа анализа данных — дифференцированно в пределах клеток отдельных митозов или совокупно в пределах клеточной популяции при данном сроке культивирования.

Возможности протокола продемонстрированы на примере эмпирических результатов анализа динамики *in vitro* цитогенетических показателей в лимфоцитах больных РТМ после ЛТ.

Выводы: Разработанный протокол и компьютерная программа регистрации результатов хромосомного анализа позволяют существенно повысить эффективность цитогенетического исследования при оценке изменений спектра aberrантных метафаз и процессов трансмиссии хромосомных повреждений в ряду постлучевых митозов в неравномерно облученной клеточной популяции, а также способствуют выработке объективных критериев для изучения отдаленной генетической нестабильности на хромосомном и субклеточном уровне.

Ключевые слова: aberrации хромосом, геномные нарушения, лимфоциты, долгосрочное культивирование, неравномерное облучение.

Objective: To elaborate an optimized protocol for registration and initial statistical treatment of cytogenetic analysis results obtained at different culture time in human blood lymphocytes after radiation exposure.

Material and Methods: Conventional cytogenetic analysis was carried out in FPG-stained preparations made from 50- and 76-hr cultures of peripheral blood lymphocytes sampled from 15 patients with uterine cancer (stages I–II) after external beam or combined radiation therapy; the programme was created using Rapid Application Development Environment Inprise Borland C++ Builder 6 and database core Borland Database Engine.

Results: The original detailed protocol and its computerised version are proposed for the full-scale analysis of the cytogenetic damage spectrum, which could be observed in long-term cultures of human lymphocytes after radiation exposure. The protocol is based on the evaluation of 30 parameters (various types of chromosomal rearrangements and genomic damage) and allows to calculate yields and to construct per-cell distributions of particular cytogenetic abnormalities or their arbitrary combinations. A special attention was paid to the chromosome fragments (accompanying the exchanges and replicated status). The possibility for choosing the way of data analysis was foreseen, that were either differentially within the particular mitosis or within the combined heterogeneous cell population at the particular culture time.

The practical possibilities of the protocol were demonstrated using the empirical example, which represented the analysis of cytogenetic indices *in vitro* dynamics in lymphocytes of uterine cancer patients after radiation treatment.

Conclusion: The proposed protocol and its computerized version allow to enhance significantly the efficacy of cytogenetic assay for evaluating the changes of aberrant cell spectrum and studying the chromosome damage transmission through several post-radiation mitoses in the cell population inhomogeneously exposed to ionizing radiation. It also promotes the elaboration of the appropriate criteria for investigating the late genetic instability on the chromosomal and sub-cellular levels.

Key words: chromosome aberrations, genomic damage, lymphocytes, long-term cultivation, radiation exposure.

Одним із найінформативніших способів дослідження радіогенних ефектів на субклітинному рівні у людини є цитогенетичний аналіз культури лімфоцитів крові [1, 2]. За допомогою даної тест-системи поряд із іншими фундаментальними проблемами радіобіології та радіаційної генетики вивчають закономірності індукції, трансмісії та елімінації структурних

аберацій хромосом у послідовних пострадіаційних клітинних генераціях [3–23], а останніми роками розпочалися цілеспрямовані дослідження віддаленої генетичної нестабільності та «ефекту спостерігача» [24–32].

Аналіз літературних джерел показав, що вивчення трансмісії хромосомних перебудов було сконцентровано переважно на оцінці ймо-

вірності виживання або елімінації аберацій тільки хромосомного типу, здебільшого у перших двох-трьох пострадіаційних мітотичних циклах, причому виключно у нормоплоїдних клітинах [3, 5, 6, 11, 13–19, 22, 23, 26, 32]. Аналогічні дослідження із охопленням ширшого спектра цитогенетичних показників чи в більш віддалених клітинних генераціях менш численні [4, 8, 10, 12, 20, 21, 27–31]. При цьому, на відміну від достатньо відтворюваних основних цитогенетичних закономірностей за стандартних умов культивування клітин (протягом 48–52 годин), будь-яка спроба зіставлення даних різних досліджень у довготермінових культурах демонструє суперечливі висновки.

Така невизначеність має як методичний, так і суто технічний характер; її причинами є відсутність уніфікованого підходу до реєстрації й аналізу результатів цитогенетичного дослідження при використанні довготермінових культур лімфоцитів, а також труднощі у розпізнаванні хромосомних перебудов, успадкованих нащадками первинно опромінених попередників і тих, що виникли *de novo*. Зокрема, відомою особливістю перебігу хромосомних аберацій у клітинних генераціях є реплікативне подвоєння успадкованих фрагментів у наступних циклах [3–5, 11–14, 23], втім у деяких дослідженнях даний ефект не враховано, й отримана у послідовних мітозах картина розцінена як надмірне виникнення «зайвих» ацентриків. Крім того, при опроміненні лімфоцитів у високих дозах вихідний спектр абераційних клітин, як правило, містить певну частку метафаз із одночасною наявністю декількох хромосомних обмінів із супутніми фрагментами та вільних ацентриків. Унаслідок цього незалежна мітотична сегрегація обмінних і фрагментних перебудов під час першого пострадіаційного поділу супроводжується сатураційним ефектом, що разом із природним реплікативним подвоєнням фрагментів у другому мітотичному циклі спричиняє артефактну реєстрацію «повних» хромосомних обмінів у дочірніх клітинах [22, 23].

Ще більші ускладнення при спробах дослідити долю радіогенних цитогенетичних ефектів виникають у випадках негомогенного опромінювання при наддисперсному характері по-

клітинного розподілу первинно індукованих аберацій. За таких умов припущення про незалежну індукцію та Пуассонівську рандомізованість обмінних і фрагментних аберацій не можна застосовувати як вихідні параметри для моделювання очікуваної картини трансмісії та елімінації хромосомних перебудов [5–7, 11, 13, 14, 22, 23], виникає необхідність зіставляти емпіричні поклітинні розподіли та зустрічальність різних видів аберацій у послідовних мітозах.

Метою нашого дослідження була розробка оптимізованого протоколу реєстрації та первинної статистичної обробки результатів хромосомного аналізу при різних термінах культивування лімфоцитів крові людини після нерівномірного опромінювання.

Методика дослідження

У роботі використані результати цитогенетичного аналізу FPG-забарвлених метафазних препаратів 50- і 76-годинних культур лімфоцитів периферичної крові 15 хворих на рак тіла матки (РТМ) I–II стадій після закінчення курсу променевого лікування (ПЛ) (дистанційної чи поєднаної гамма-терапії). Результати індивідуальних досліджень об'єднувалися в залежності від терміну культивування лімфоцитів (50 чи 76 годин) або номера мітозу. При статистичній обробці визначали середні рівні цитогенетичних ушкоджень на 100 клітин; стандартні похибки середніх обчислювали, виходячи з дисперсії поклітинних розподілів аберацій. Комп'ютерна програма реєстрації результатів хромосомного аналізу створювалась із використанням середовища розробки програмного забезпечення Inprise Borland C++ Builder 6 та ядра баз даних Borland Database Engine (Inprise Corp.).

Результати та їх обговорення

При вивченні закономірностей індукції цитогенетичних ушкоджень під впливом іонізуювальних випромінень хромосомний аналіз лімфоцитів крові людини традиційно сконцентровано на структурних хромосомних перебудовах, високо специфічних до радіаційного чинника — дицентричних, поліцентричних і кільцевих хромосомах; саме ці види аберацій використовують для кількісної оцінки дози опромінення при проведенні біологічної детекції радіаційного впливу. Вільні ацентричні фрагменти, також реєстровані при аналізі, зазвичай додатково характеризують картину аберацій хромосомного типу. Виняток становлять дані щодо їхньої частоти, які застосовують у

спеціальних біодозиметричних розрахунках при нерівномірному опроміюванні [2].

Інша ситуація виникає при дослідженнях долі аберацій у послідовних пострадіаційних клітинних генераціях, спробах оцінки мітотичної компоненти радіаційної загибелі клітин і вивченні феноменів віддаленої генетичної нестабільності та «ефекту спостерігача». На нашу думку, є цілком очевидним, що в даних випадках методологія дослідження вимагає не тільки використання довготермінових культур лімфоцитів, але й адекватної системи реєстрації усього спектра цитогенетичних аномалій та диференційного аналізу частоти кожного виду структурних хромосомних перебудов, які можна розподілити за трьома категоріями:

індуковані у безпосередньо опромієних клітинах;

успадковані нащадками первинно опромієних попередників;

які виникли *de novo* в клітинах-нащадках чи в первинно інтактних клітинах.

Крім того, для повнішої оцінки віддалених радіогенних ефектів необхідна реєстрація геномних порушень — гіперплоїдії та поліплоїдії, особливо зважаючи на те, що останній показник може відігравати істотну роль при врахуванні загального проліферативного потенціалу опромієної клітинної популяції та кількісному визначенні мітотичної компоненти радіаційної загибелі клітин.

Про варіабельність при дотриманні цих вимог свідчить аналіз різних публікацій із результатами вивчення долі нестабільних аберацій хромосом *in vitro* у клітинах різних мітозів при різних термінах культивування лімфоцитів крові людини чи клітин лабораторних тварин.

Автори [18] досліджували долю дицентриків у послідовних мітозах незалежно від наявності/відсутності супутніх фрагментів. У працях [19, 20] реєструвалися дицентрики і центричні кільця (у [19] — тільки дицентрики) незалежно від наявності супутніх фрагментів, а число хромосомних фрагментів наведено без зазначення їхнього статусу — супутні, вільні чи репліковані. У публікації [8] описано вихід дицентриків і кільця незалежно від наявності супутніх фрагментів та вихід ацентриків без зазначення їхнього статусу, хоча додатко-

во й представлені кількісні пропорції дицентриків із та без супутніх фрагментів. Автори [17] оцінили частоту дицентриків і центричних кільць, не зазначаючи наявності супутніх фрагментів; частоту вільних ацентричних фрагментів наводять окремо, але без визначення пропорції реплікованих структур. У праці [21] центричні кільця також зареєстровані без урахування супутніх фрагментів; для вільних ацентричних фрагментів пропорція реплікованих не вказана, хоча й диференційно визначено число дицентриків із супутніми фрагментами та без них.

У дослідженнях [32, 33] серед нестабільних аберацій хромосомного типу зареєстровані дицентрики і кільцеві хромосоми (незважаючи на наявність супутніх фрагментів) та ацентричні фрагменти (без визначення статусу вільних чи супутніх та пропорції реплікованих структур); в обох працях визначена частота хроматидних фрагментів, а в [32] — ще й хроматидні обміни.

У публікації [9] визначена частота клітин із хроматидними абераціями, дицентриків і кільцевих хромосом незалежно від наявності супутніх фрагментів; ураховано розподіл на вільні та супутні фрагменти, але без ідентифікації реплікованих структур.

При вивченні трансмісії хемічно індукованих хромосомних ушкоджень автори [7] враховували обмінні аберації та вільні фрагменти, не зазначивши, втім, серед останніх ані їхнього типу (хромосомні чи хроматидні), ані пропорції реплікованих ацентриків.

У праці [10] визначені хроматидні фрагменти, хроматидні обміни, дицентрики і центричні кільця (незалежно від наявності супутніх фрагментів) та вільні ацентричні фрагменти (без пропорції реплікованих структур); зазначена присутність поліплоїдів (зокрема, аберантних) та наявність серед клітин другого-третього мітозу диплоїдних метафаз із подвоєними дицентриками.

У публікаціях [15, 16] серед окремих видів нестабільних хромосомних перебудов були визначені хроматидні обміни та дицентрики і центричні кільця без урахування наявності/відсутності супутніх фрагментів; ацентричні фрагменти включені до суми всіх аберацій,

хоча в праці [16] окремо вказана кількість ацентриків у клітинах з 1 дицентриком та відсоток подвоєних ацентриків у клітинах другого і третього мітозів.

У дослідженні [3] вихід цитогенетичних ушкоджень представлений у вигляді дицентриків і кілець незалежно від наявності супутніх фрагментів, а у випадку ацентричних фрагментів — без визначення вільних чи супутніх, але із диференціацією на подвоєні та неподвоєні; додатково вказано число анеуплоїдних клітин та зазначена присутність почетверених ацентриків у клітинах третього мітозу.

Із використанням емпіричних даних згаданої публікації [3] автори [5] провели моделювання із визначенням частоти вільних ацентричних фрагментів у клітинах першого мітозу та сумарної частоти вільних і супутніх, реплікованих і нереплікованих фрагментів — у клітинах другого мітозу.

У дослідженні [6] врахована сума дицентриків і кільцевих хромосом незалежно від наявності супутніх фрагментів, сума вільних і супутніх ацентричних фрагментів та окремо — вихід ацентричних фрагментів у клітинах без хромосомних обмінів, хоча й не зазначена пропорція реплікованих ацентриків; вказана наявність поліплоїдних клітин із частотою не більше ніж 5 % від загальної кількості метафаз.

Автори [14] враховували у першому мітозі суму дицентриків і кілець із супутніми фрагментами та вільні ацентричні фрагменти, у другому мітозі — дицентрики і кільця, незважаючи на наявність супутніх фрагментів та подвоєні ацентрики окремо в клітинах із та без хромосомних обмінів; відзначено, що клітини другого мітозу із неподвоєними ацентричними структурами не були включені до аналізу, а їхня частота не перевищувала 5 % від загальної кількості клітин з ацентриками.

У праці [22] до аналізу включалися дицентрики і кільцеві хромосоми тільки із супутніми фрагментами, та окремо — вільні ацентричні фрагменти, пропорція реплікованих ацентриків не вказана. Цей цикл досліджень було продовжено [23], і в результатах представлено вихід дицентриків і кільцевих хромосом із супутніми фрагментами, причому для дицентриків у другому мітозі зазначена пропорція подвоєних

супутніх фрагментів; також представлено поклітинний розподіл суми вільних і супутніх фрагментів, хоча й без пропорцій реплікованих ацентриків у клітинах із різною кількістю ацентричних структур.

Кілька праць присвячені результатам цитогенетичних досліджень в умовах дуже довготривалого культивування клітин. Автори [27] реєстрували хромосомні та хроматидні фрагменти, дицентрики та центричні кільця незалежно від наявності/відсутності супутніх фрагментів, а також відзначали число геномних порушень (гіпо- та гіперплоїдії, у тексті — поліплоїдії). В праці [30] наведені дані про частоту хроматидних і хромосомних обмінів (останні включали як стабільні, так і нестабільні перебудови). У результатах циклу [28, 29] представлені сумарні частоти аберацій хромосомного і хроматидного типів без диференційного аналізу за видами перебудов. Автори [31] досліджували спонтанний мутагенез у довготермінових культурах лімфоцитів людини із урахуванням рівня аберацій метафаз (не визначаючи внески клітин із абераціями різних типів чи наявність реплікованих фрагментів); додатково описали вихід геномних порушень (поліплоїдів та ендореплікацій).

У циклі публікацій [11, 12] у числовій формі наведено вихід вільних ацентриків та дицентриків із та без фрагментів. Зазначена також присутність у клітинах другого і подальших мітозів реплікованих ацентричних структур (вільних і супутніх до хромосомних обмінів). У спеціалізованому дослідженні долі фрагментних аберацій у послідовних мітозах автори [26] реєстрували хроматидні, хромосомні та подвоєні хромосомні фрагменти.

Спектр аберацій детально представлено в працях [4, 13]. У перших із зазначених робіт [4] автори диференційовано визначили дицентрики із супутніми фрагментами, без них та із подвоєними фрагментами, центричні кільця, суму вільних та супутніх фрагментів, вільні ацентричні фрагменти із розподілом на звичайні, подвоєні, потроєні та почетверені, а також хроматидні фрагменти. У другій праці [13] аналіз даних проведено за такими показниками — дицентрики і центричні кільця незалежно від

наявності супутніх фрагментів; сума супутніх та вільних фрагментів; ацентрики у клітинах другого мітозу із дицентриками та без дицентриків, а також частка реплікованих структур серед усіх ацентриків. Описано розподіл дицентриків із фрагментами, без них та із реплікованими супутніми фрагментами.

У дослідженнях, здійснених класичним хромосомним методом без використання спеціалізованих методик забарвлення (G-бендинг чи FISH), додатково проводили реєстрацію стабільних хромосомних перебудов за результатами групового каріотипування, що полягало у визначенні атипових моноцентриків (суми транслокацій, інверсій, інсерцій, інколи — делетованих хромосом) [3, 4, 9, 10, 12, 15, 16, 32, 33].

У деяких публікаціях вміщено опис поклітинних розподілів обмінних аберацій (дицентриків чи суми аберацій) у послідовних мітозах, інколи автори намагалися представити взаєморозподіли різних видів хромосомних перебудов по клітинах; це, головним чином, стосувалося виходу ацентричних фрагментів чи стабільних аберацій (транслокацій) у клітинах із наявністю/відсутністю дицентриків [6, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 22, 23].

На відміну від проаналізованих робіт, ми пропонуємо максимально деталізований протокол для комплексного представлення спектра цитогенетичних ушкоджень, які можуть траплятися в клітинах довготермінової культури лімфоцитів людини після радіаційного впливу (табл. 1). Крім набору параметрів, що зазвичай використовують для біологічної дозиметрії і який охоплює лише дицентрики та кільцеві хромосоми із супутніми фрагментами та вільні ацентричні фрагменти, наш спосіб реєстрації даних ураховує ще 27 показників, для кожного з яких обчислюється частота у вибірці проаналізованих клітин (нормоплоїдних метафаз — у випадку структурних перебудов, усіх метафаз — у випадку поліплоїдів). Також уможливується визначення похідних параметрів (сумарної частоти обраних видів аберацій чи геномних порушень) й розподілу певного виду аберацій (суми аберацій) по клітинах і взаємних розподілів обраних видів хромосомних перебудов.

З огляду на великий обсяг часу, потрібний

для роботи з різноманітними показниками, ми розробили комп'ютеризовану версію протоколу, яка значно полегшує й прискорює добір необхідних параметрів та їхню первинну статистичну обробку. Робота із програмою полягає в первинному визначенні числа проаналізованих метафаз та реєстрації кожної клітини із цитогенетичними аномаліями (абераціями чи порушеннями плоїдності). Набір аберацій в абераційній клітині описується в порядку, наведеному в табл. 1. Для кожного виду хромосомних перебудов вказується абсолютне значення у даній клітині (0, 1, 2... і т.д.). Програма автоматично підраховує суму поліплоїдів, визначає число нормоплоїдних клітин і суму абераційних метафаз серед нормоплоїдів. Для кожного виду хромосомних перебудов автоматично будується поклітинний розподіл, який становить число клітин із 0, 1, 2... і т.д. абераціями, після чого обчислюється сума аберацій даного виду. В разі необхідності за допомогою програми можна побудувати взаєморозподіли різних видів аберацій по клітинах — наприклад, представити число атипових моноцентриків у клітинах без дицентриків чи з 1, 2... і т.д. дицентриками. Користувач також може побудувати загальний розподіл нестабільних хромосомних обмінів (дицентриків і кільцеві) із супутніми фрагментами, без них та взагалі обчислити частку реплікованих фрагментів із та без урахування супутніх до хромосомних обмінів. Запропонована комп'ютерна версія протоколу також допомагає оцінювати спектр поліплоїдів в аспектах плоїдності, наявності та реплікованості структурних ушкоджень хромосом. Програма дозволяє вільно обирати спосіб інтерпретації даних (диференційний аналіз у клітинах кожного мітозу на певній точці культивування, сумарний аналіз клітин певного мітозу при різних термінах культивування чи загальний аналіз усієї сукупності клітин у культурах певної тривалості — симуляція рутинного забарвлення).

Апробація протоколу проведена на прикладі результатів дослідження динаміки *in vitro* цитогенетичних показників у лімфоцитах хворих на РТМ після ПЛ. У табл. 2 наведено результати порівняння частоти хромосомних перебудов і геномних порушень, виявлених у клітинах

Протокол реєстрації цитогенетичних ушкоджень у довготермінових культурах лімфоцитів крові людини після радіаційного впливу

Protocol of cytogenetic damage registration in long-term cultures of human blood lymphocytes after radiation exposure

Показник та його позначення	Примітка
Сума проаналізованих клітин — Total Cells	Нормоплоїдні, гіперплоїдні та поліплоїдні клітини
Нормоплоїдні клітини — 2 N Cells	Сума нормоплоїдних та гіперплоїдних клітин
Аберантні клітини — Ab Cells	Тільки серед нормоплоїдних та гіперплоїдних клітин
Дицентрики:	
із фрагментами — Dic fr;	Поліцентрики враховують як n-1 дицентриків, де n — число центромір поліцентрика. За наявності в клітині водночас нереплікованих і реплікованих ацентриків максимально досяжні репліковані фрагменти враховують як супутні до дицентриків і кілець. За наявності у клітині водночас дицентриків і кілець максимально досяжні репліковані та нерепліковані фрагменти враховують як супутні до дицентриків
без фрагментів — Dic;	
із подвоєними фрагментами — Dic 2*[fr];	
із потроєними фрагментами — Dic 3*[fr];	
із почотвереними фрагментами — Dic 4*[fr]	
Центричні кільця:	
із фрагментами — CR fr;	Можуть супроводжуватися нереплікованими фрагментами
без фрагментів — CR;	
із подвоєними фрагментами — CR 2*[fr];	
із потроєними фрагментами — CR 3*[fr];	
із почотвереними фрагментами — CR 4*[fr]	
Репліковані хромосомні обміни:	
подвоєні дицентрики — 2*[Dic] (fr);	Можуть супроводжуватися нереплікованими фрагментами
подвоєні кільця — 2*[CR] (fr);	
почотверені кільця — 4*[CR] (fr)	
Вільні ацентрики:	
ацентричні фрагменти — Ac;	За наявності в клітинах із дицентриками і центричними кільцями число вільних ацентриків визначається після відрахування супутніх фрагментів, які супроводжують хромосомні обміни
подвоєні ацентрики — 2*[Ac];	
потроєні ацентрики — 3*[Ac];	
почотверені ацентрики — 4*[Ac]	
Атипові моноцентрики:	
транслокації — Tn;	Унаслідок труднощів точної ідентифікації об'єднуються до однієї категорії
делетовані хромосоми — Del Chs	
Хроматидні аберації:	
обміни — Ct Exch;	Можуть виникати в хромосомах, уже залучених до аберацій хромосомного типу
фрагменти — Ct Br	
Гіперплоїдні клітини (число зайвих центромірних структур):	
Нур # 1;	Можуть містити аберації, зокрема, репліковані хромосомні обміни (2*[Dic]; 2*[CR]; 4*[CR]), які є джерелом гіперплоїдизації
Нур # 2;	
Нур # 3;	
Нур # ≥4	
Поліплоїдні клітини (плоїдність геному):	
Ppl 3 N;	За наявності структурних хромосомних перебудов репліковані та нерепліковані аберації реєструються за зазначеними вище критеріями
Ppl 4 N;	
Ppl 5 N;	
Ppl 6–8 N	
Ендореплікації	
Erp	

Порівняння частоти цитогенетичних ушкоджень у 50- і 76-годинних культурах лімфоцитів онкохворих після ПЛ
Comparison of cytogenetic damage incidence in 50- and 76-hour lymphocyte cultures of cancer patients after radiation therapy

Показник	Частота на 100 клітин ± SE		Показник	Частота на 100 клітин ± SE	
	50-годинна культура	76-годинна культура		50-годинна культура	76-годинна культура
Total Cells	1632	3601	Tn+Del Chs	3,19 ± 0,45	1,95 ± 0,24
2 N Cells	1601	3438	Ct Exch	0,50 ± 0,18	0,44 ± 0,11
Ab Cells	30,92 ± 1,16	15,39 ± 0,62	Ct Br	2,06 ± 0,36	1,83 ± 0,23
Dic fr	28,23 ± 2,01	5,03 ± 0,57	Extra Chs	0,44 ± 0,19	0,70 ± 0,20
Dic	2,50 ± 0,46	3,87 ± 0,37	Hyp #1	0,31 ± 0,14	0,32 ± 0,10
Dic 2*[fr]	2,81 ± 0,54	0,90 ± 0,17	Hyp #2	0,06 ± 0,06	0,09 ± 0,05
Dic 3*[fr]	0	0,03 ± 0,03	Hyp #3	0	0,03 ± 0,03
Dic 4*[fr]	0	0,09 ± 0,05	Hyp #≥ 4	0	0,03 ± 0,03
2*[Dic]	0	0,09 ± 0,05	Erp	0,06 ± 0,06	0
CR fr	2,69 ± 0,42	0,38 ± 0,11	Ppl noAbs	0,67 ± 0,20	2,36 ± 0,25
CR	0,38 ± 0,15	0,55 ± 0,13	- 3 N	0,06 ± 0,06	0,86 ± 0,15
CR 2*[fr]	0,19 ± 0,11	0,12 ± 0,06	- 4 N	0,61 ± 0,19	1,42 ± 0,20
CR 3*[fr]	0	0,03 ± 0,03	- 5 N	0	0,03 ± 0,03
2*[CR]	0	0,03 ± 0,03	- 6-8 N	0	0,06 ± 0,04
4*[CR]	0	0,03 ± 0,03	Aberrant Ppl	1,16 ± 0,27	2,22 ± 0,25
Ac	15,62 ± 1,34	3,99 ± 0,40	- 3 N	0,12 ± 0,09	0,33 ± 0,10
2*[Ac]	0,56 ± 0,21	1,34 ± 0,23	- 4 N	1,04 ± 0,25	1,72 ± 0,22
3*[Ac]	0	0,06 ± 0,06	- 5 N	0	0,06 ± 0,04
4*[Ac]	0	0,12 ± 0,06	- 6-8 N	0	0,11 ± 0,06

Примітка. Тут і далі: позначення показників наведено згідно з протоколом (див. табл. 1).

культури стандартної і подовженої тривалості — 50 і 76 годин. При збільшенні термінів культивування спостерігалось дворазове зниження частоти аберантних метафаз серед нормоплоїдних клітин. Зменшення рівня структурних хромосомних перебудов відбувалося за рахунок таких видів аберацій, як дицентрики і центричні кільця із супутніми фрагментами і вільні ацентричні фрагменти. В 76-годинній культурі збільшувалась представленість хромосомних обмінів із втраченими супутніми фрагментами і подвоєних вільних ацентриків, а також з'являлися клітини, які містили потроєні та почотверені фрагменти (вільні чи супутні до дицентриків і кільця) і репліковані хромосомні обміни. При подовженні термінів культивування частота аберацій хроматидного типу була стабільною, рівень гіперплоїдії та поліплоїдії підвищувався, причому в першому випадку — за рахунок клітин із 2–4 зайвими хромосомами, а в другому — внаслідок зростання як абе-

рантних, так і неаберантних клітин із тотально ампліфікованим геномом.

В об'єднаній вибірці метафаз, проаналізованих на двох зазначених термінах культивування, був побудований розподіл виявлених цитогенетичних ушкоджень за належністю до клітин першого, другого, третього і подальших мітозів (табл. 3). Виявилось, що половина всіх аберантних нормоплоїдних клітин становила перший постпроменевиий мітоз, тоді як аберантні та неаберантні поліплоїди з'являлися здебільшого в другому і подальших мітотичних циклах (зокрема, клітини із плоїдністю 5–8 N траплялися виключно в третьому і подальших мітозах). Розподіл мітозної належності атипичних моноцентриків і хроматидних фрагментів взагалі наближався до розподілу проаналізованих метафаз, але серед клітин-носіїв хроматидних обмінів була визначена аномально висока пропорція других мітозів. Переважна більшість дицентриків і кільцевих хромосом із супутніми

Таблиця 3

Розподіл цитогенетичних ушкоджень між клітинами різних мітозів у культурі лімфоцитів онкохворих після ПЛ (об'єднані дані термінів культивування 50 і 76 годин)
Distribution of cytogenetic damage between the cells of different mitoses of cancer patients' lymphocyte culture after radiation therapy (combined data from 50 and 76 hour cultures)

Показник	Разом	Розподіл між мітозами, %		
		M 1	M 2	M 3 (+)
Total Cells	5233	36,5	18,8	44,7
2 N Ab Cells	1024	52,4	21,0	26,6
Dic fr	625	93,9	4,0	2,1
Dic	173	6,4	39,3	54,3
Dic 2*[fr]	76	2,6	84,2	13,2
CR Fr	56	94,6	3,6	1,8
CR	25	4,0	36,0	60,0
CR 2*[fr]	7	14,3	57,1	28,6
Dic+CR 3-4*[fr]	5	0	0	100,0
2-4* [Dic+CR]	5	0	40,0	60,0
Ac	387	73,9	13,2	12,9
2*[Ac]	55	3,6	43,6	52,7
3-4*[Ac]	5	0	0	100
Tn+Del Chs	118	43,2	21,2	35,6
Ct Exch	23	17,4	30,4	52,2
Ct Br	96	42,7	16,7	40,6
Нур #1	16	6,2	31,3	62,5
Нур #2-4	6	0	33,3	66,7
Ppl 3-4 N (Ab)	186 (93)	8,6 (5,4)	39,8 (50,5)	51,6 (44,1)
Ppl 5-8 N (Ab)	9 (6)	0	0	100,0 (100,0)

Примітка. M1, M2, M3(+) — клітини першого, другого, третього і подальших мітозів.

фрагментами та вільних ацентриків належала до першого мітотичного циклу. Клітини другого мітозу домінували в розподілі нестабільних хромосомних обмінів із подвоєними супутніми фрагментами. Для метафаз третього і подальших мітозів були характернішими репліковані вільні ацентрики, дицентрики і кільця із втраченими фрагментами та з потроєними-почетвереними фрагментами, а також репліковані хромосомні обміни та гіперплоїдія.

Вплив урахування/неврахування реплікованості обмінних і фрагментних аберацій на загальний результат цитогенетичного дослідження проілюстровано табл. 4. Можна побачити, що реєстрація подвоєних-почетверених обмінів та, особливо, фрагментів у вигляді відпо-

відної кількості окремих перебудов спричиняє надмірну кількість переобтяжених абераціями метафаз (із ≥ 2 перебудовами) у розподілах клітин другого та подальших мітозів. Так, при неврахуванні реплікованого статусу хромосомних перебудов 83 % клітин другого мітозу і 74 % третього й подальших мітозів із 2 абераціями насправді містили тільки одну аберацію — вільний подвоєний ацентрик, хромосомний обмін із подвоєним супутнім фрагментом чи подвоєні хромосомні обміни. Пропорції хибно-розпізнаних клітин серед метафаз із 3–4 і ≥ 5 перебудовами дорівнювали відповідно 67 і 83 % у клітинах другого мітозу та 76 і 100 % — у клітинах третього й подальших мітозів. Отже, нехтування феноменом природної реплікації радіогенних аберацій після передачі в дочірні клітини може призвести до істотного викривлення в оцінці реального ступеня ураженості хромосомного апарату і неправильного висновку про надзвичайно ефективну трансмісію хромосомних ушкоджень та активний розвиток генетичної нестабільності в опроміненій клітинній популяції. Натомість використання запропонованого нами протоколу дозволяє уникнути цього негативного ефекту і вивчати закономірності динаміки рівня радіаційно-індукованих аберацій *in vitro* з об'єктивних позицій.

Одним із важливих аспектів проблеми трансмісії радіогенних аберацій і виживання абераційних клітин є визначення впливу сумісної індукції різних видів хромосомних перебудов на подальшу їхню долю у послідовних мітозах. Для демонстрації можливостей комп'ютеризованої версії нашого протоколу на рис. 1 представлено зміни в послідовних мітозах *in vitro* частоти дицентриків — залежно від наявності та реплікованості супутніх фрагментів, центричних кілець — залежно від присутності в клітинах без дицентриків, атипичних моноцентриків — залежно від присутності в клітинах без нестабільних хромосомних обмінів та інших аберацій хромосомного типу.

Найскладнішим при вивченні процесів трансмісії аберацій у низці пострадіаційних мітозів є аналіз ацентричних фрагментів. У даному випадку доводиться водночас враховувати статус фрагмента (тобто чи є він віль-

Поклітинні розподіли нестабільних аберацій хромосомного типу в метафазах різних мітозів із та без урахування реплікованості
Intercellular distribution of unstable chromosome type aberration in metaphases of different mitoses with and without considering of replication

Мітоз	Загальна кількість клітин	СР	Розподіл аберантних клітин за числом аберацій												Total Abs
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
М 1	1892	А	275	105	54	26	13	5	6	2	0	0	2	1	938
		Б	274	105	54	27	13	5	6	2	0	0	2	1	941
М 2	909	А	141	29	9	3	1	0	1	0	0	0	0	0	250
		Б	90	70	7	11	1	3	0	1	0	1	0	0	336
М 3(+)	2238	А	172	15	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	227
		Б	132	42	4	13	1	0	0	2	0	0	0	0	307

Примітка. СР — спосіб реєстрації; А — реплікована структура враховувалася як одна аберація; Б — кожна компонента реплікованої структури враховувалася як окрема аберація; Total Abs — сума аберацій.

ним або супутнім до обміну), для вільних фрагментів — ймовірність виникнення у клітинах із нестабільними хромосомними обмінами, а також реплікованість/нереплікованість у клітинах послідовних мітозів. Одним із можливих підходів до первинного уявлення й узагальнення даних трансмісії фрагментних аберацій є побудова поклітинного взаєморозподілу фрагментів та обмінів у клітинах першого

й другого мітозів у культурі (табл. 5). У такий спосіб для кожного класу клітин із певним числом фрагментних та обмінних аберацій можна визначити частоту у вибірках клітин першого й другого мітозів, вивести загальний рівень фрагментних аберацій та обчислити пропорції реплікованих ацентричних структур як для суми вільних і супутніх фрагментів, так і для кожної категорії окремо. Саме ці дані можуть

Таблиця 5

Порівняння поклітинного взаєморозподілу незбалансованих хромосомних обмінів і фрагментів у метафазах першого і другого мітозів
Comparison of intercellular distribution of unbalanced chromosome exchanges and fragments in metaphases of the first and second mitoses

А. Перший мітоз

Ac+fr	Dic + CR											Сума клітин із Ac+fr
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0	1403	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1403
1	92	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	259
2	12	36	60	0	0	0	0	0	0	0	0	108
3	5	9	18	25	0	0	0	0	0	0	0	57
4	1	0	11	5	9	0	0	0	0	0	0	26
5	1	0	1	4	1	4	0	0	0	0	0	11
6	0	0	1	0	1	3	0	0	0	0	0	5
7	1	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	6
8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Сума клітин із даним числом Dic+CR	1515	224	91	34	11	9	2	4	0	2	0	Усього 489 аберантних клітин

Б. Другий мітоз

Ac+fr	Реплікованість фрагментів	Dic + CR						із Ac+fr
		0	1	2	3	4	5	
0	–	725	52 ^b	3	1	2	0	781
1	–	25	19 ^{b,c}	1	1	0	0	46
	+	14 ^a	38 ^c	7	1	0	0	60
2	–	6 ^a	2	1	0	0	0	9
	+	3	3	2	0	0	0	8
3	–	2	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	1	2	0	1 ^d	4
4	–	0	0	0	0	0	1 ^d	1
	+	0	0	0	0	1	0	1
5	–	0	0	0	1	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0
Сума клітин із даним числом Dic+CR		774 ^a	110 ^c	15	6	3	1 ^d	Усього 184 аберантні клітини

Примітка. а — одна клітина (2 ac + 2*[ac]), представлена двічі; b — в тому числі дві клітини (2*[dic] fr), кожна з яких представлена двічі: як (dic) і як (dic fr); c — дві клітини (dic 2*[fr] + ac), представлені двічі; d — одна клітина (3 dic 2*[fr] + 2 dic fr + 2 ac), представлена двічі.

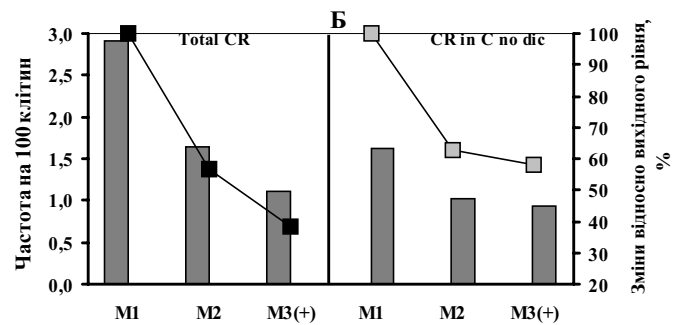
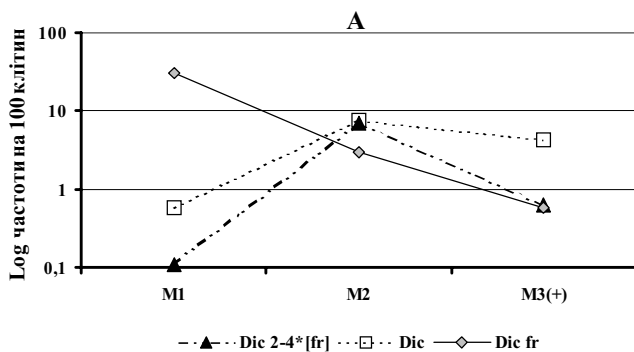
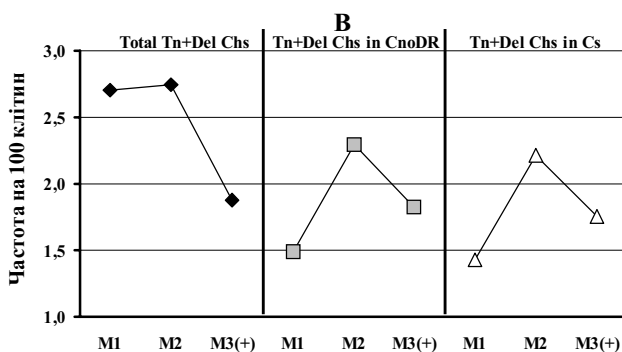


Рис. 1. Частота різних видів аберацій у клітинах послідовних мітозів (M1, M2, M3+): А — дицентрики залежно від наявності та реплікованості супутніх фрагментів; Б — центричні кільця ззагалі (total) та в клітинах без дицентриків (in C no dic); В — атипові моноцентрики ззагалі (total), в клітинах без нестабільних хромосомних обмінів (in C noDR) та без інших нестабільних аберацій хромосомного типу (in Cs)



Frequency of different types of aberrations in the cells of consequent mitoses (M1, M2, M3+): А — dicentric chromosomes depending on the presence and replication of accompanying fragments; Б — centric rings, both total and in the cells without dicentric chromosomes; В — total atypical monocentric chromosomes in the cells without unstable chromosome exchange and without other unstable chromosome type aberrations

становити основу для кількісних розрахунків імовірності трансмісії аберацій та мітотичного виживання клітин із застосуванням як класичного алгоритму [5], так і будь-якої з його пізніших модифікацій [7, 13, 14]. Проте, слід зазначити, що жодна з математичних моделей, наведених у літературі, не враховує такий варіант,

як трансмісія фрагментів без реплікації та обмінів із реплікацією у наступному мітотичному циклі, хоча дані нашого дослідження та інших авторів [3–5, 13, 23] свідчать про досить високу частоту цього феномена. Зазначене зумовлює необхідність побудови нової моделі, яка б краще відповідала різноманітності сценаріїв

поведінки хромосомних ушкоджень і адекватніше відтворювала реальну картину перебігу радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів у клітинних генераціях.

ВИСНОВКИ

1. Запропонований нами протокол та комп'ютерна програма реєстрації результатів хромосомного аналізу дозволяє підвищити ефективність цитогенетичного дослідження у двох напрямках: по-перше, при відстеженні змін спектра аберантних метафаз і процесу трансмісії хромосомних ушкоджень у низці постпроменевих мітозів у нерівномірно опроміненій клітинній популяції, по-друге, при вивченні різноманітних проявів віддаленої генетичної нестабільності на хромосомному і субклітинному рівні із використанням об'єктивних критеріїв оцінки цього феномена.

2. Безпосереднім предметом досліджень, які ми плануємо реалізувати найближчим часом із застосуванням даного протоколу, стане порівняльна характеристика закономірностей персистенції радіогенних цитогенетичних ефектів *in vitro* та *in vivo* в лімфоцитах терапевтично опроміненних пацієнтів із різним вихідним рівнем хромосомних ушкоджень.

Література

1. Bender M. A. // *Stem Cells*. — 1995. — Vol. 13. — P. 172–181.
2. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment*. IAEA Techn. Report Series № 405. — Vienna: IAEA, 2001. — 127 p.
3. Sasaki M. S., Norman A. // *Nature*. — 1967. — Vol. 214. — P. 502–503.
4. Антошина М.М., Козлов В.М., Бочков Н.П. // *Генетика*. — 1969. — Т. 5, № 7. — С. 114–120.
5. Carrano A. V., Heddle J. A. // *J. Theor. Biol.* — 1973. — Vol. 38. — P. 289–304.
6. Carrano A. V. // *Mutat. Res.* — 1973. — Vol. 17. — P. 341–353.
7. Арутюнян Р.М., Оганян В.К., Саркисян Т.Ф. // *Генетика*. — 1977. — Т. 13, № 9. — С. 1632–1636.
8. Lloyd D. C., Dolphin G. W., Purrott R. J., Tipper P. A. // *Mutat. Res.* — 1977. — Vol. 42. — P. 401–412.
9. Мачавариани М.Г., Джемилев З.А. // *Радиобиол.* — 1978. — Т. 18, вып. 2. — С. 281–285.
10. Bedford J. S., Mitchell J. B., Griggs H. G., Bender M. A. // *Radiat. Res.* — 1978. — Vol. 76. — P. 573–586.
11. Пяткин Е.К., Нугис В.Ю. // *Цитол.* — 1981. — Т. 23, № 11. — С. 1310–1316.
12. Пяткин Е.К., Покровская В.Н., Нугис В.Ю. // *Там же*. — 1982. — Т. 24, № 11. — С. 1346–1350.
13. Яковенко К.Н., Сапачева В.А. // *Генетика*. — 1984. — Т. 20, № 1. — С. 144–154.
14. Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H. // *Radiat. Environ. Biophys.* — 1986. — Vol. 25. — P. 253–260.
15. Dutrillaux B., Viegas-Pequignot E., Prod'homme M., Sportes M. // *Mutat. Res.* — 1985. — Vol. 152. — P. 197–203.
16. Al-Achkar W., Sabatier L., Dutrillaux B. // *Ibid.* — 1988. — Vol. 198. — P. 191–198.
17. Matsuoka A., Tucker J. D., Hayashi M. et al. // *Mutagenesis*. — 1994. — Vol. 9, № 2. — P. 151–155.
18. Fernandez J. L., Campos A., Goyanes V. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1995. — Vol. 67, № 3. — P. 295–302.
19. Boei J. J. W. A., Vermulen S., Natarajan A. T. // *Mutat. Res.* — 1996. — Vol. 349. — P. 127–135.
20. Matsumoto K., Ramsey M. J., Nelson D. O., Tucker J. D. // *Radiat. Res.* — 1998. — Vol. 149. — P. 602–613.
21. Hoffmann G. R., Sayer A. M., Joiner E. E. et al. // *Environ. and Molec. Mutagen.* — 1999. — Vol. 33. — P. 94–110.
22. Guerrero-Carbajal Y. C., Moquet J. E., Edwards A. A., Lloyd D. C. // *Radiat. Prot. Dosim.* — 1998. — Vol. 76, № 3. — P. 159–168.
23. Pala F. S., Moquet J. E., Edwards A. A., Lloyd D. C. // *Mutat. Res.* — 2001. — Vol. 474. — P. 139–146.
24. Mothersill C., Seymour C. // *Radiat. Res.* — 2001. — Vol. 155. — P. 759–767.
25. Baverstock K. // *Mutat. Res.* — 2000. — Vol. 454. — P. 89–109.
26. Жлоба А. А., Севаньяев А. В. // *Докл. АН СССР*. — 1991. — Т. 316, № 5. — С. 1239–1244.
27. Holmberg K., Falt S., Johansson A., Lambert B. // *Mutat. Res.* — 1993. — Vol. 286. — P. 321–330.
28. Kadhim M. A., Lorimore S. A., Townsend K. M. S. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1995. — Vol. 67, № 3. — P. 287–293.
29. Kadhim M. A., Marsden S. J., Malcolmson A. M. et al. // *Radiat. Res.* — 2001. — Vol. 155. — P. 122–126.
30. Griffin C. S., Neshasaten-Riz A., Mairs R. J. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2000. — Vol. 76, № 7. — P. 963–969.
31. Рушковский С.Р., Безруков В.Ф., Барилляк И.Р. // *Зб. наук. праць співробітн. КМАПО*. — Вип. 8, кн. 2. — К., 1999. — С. 478–484.
32. Кузьмина Н.С., Сусков И.И. // *Радиаци. биол. Радиоекол.* — 2002. — Т. 42, № 6. — С. 735–739.
33. Сусков И.И. // *Генетика*. — 1968. — Т. 4, № 6. — С. 124–127.

Надходження до редакції: 31.03.2004.

Прийнято 19.05.2004.

Адреса для листування:

Вінніков Володимир Анатолійович,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна