

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

Освітній ступінь – магістр

на тему **«ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РАДІОМІТІГАТОРІВ НА
ФОРМУВАННЯ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ ПРИ ТЕСТ-ОПРОМІНЕННІ
КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ УМОВНО ЗДОРОВИХ ОСІБ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Спеціальності:
091 Біологія

Сапунова Олександра Олександрівна

Керівники:
Дьоміна Е. А.,
професор, доктор біологічних наук

Руссу І.З.,
кандидат біологічних наук, доцент

Рецензент Несіна І.П

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1	7
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Механізми утворення радіаційно-індукованих аберацій хромосом	7
1.2. Класифікація радіаційно-індукованих аберацій хромосом.....	10
1.3. Тест-система лімфоцитів периферичної крові як біоіндикатор опромінення організму людини	14
1.4. Радіаційнозахисні засоби: класифікація та механізми дії.....	17
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	23
РОЗДІЛ 2	23
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1. Матеріали дослідження.....	23
2.2. Методи дослідження.....	26
2.2.1. Підготовка предметних скелець.	26
2.2.2. Приготування розчинів.....	26
2.2.3. Дослідження дії радіомітігаторів.....	27
2.2.4. Розфасовка фітогемаглютиніну	27
2.2.5. Забір крові.	27
2.2.6. Культивування лімфоцитів периферичної крові.....	28
2.2.7. Умови опромінення культури лімфоцитів периферичної крові людини.....	29
2.2.8. Фіксація культури лімфоцитів периферичної крові людини.....	29
2.2.9. Приготування препаратів.	30
2.2.10. Забарвлення цитогенетичних препаратів.	31
2.2.11. Аналіз цитогенетичних препаратів.	31
2.2.12. Оцінка проліферативного потенціалу лімфоцитів крові.....	34

2.2.13. Методи статистичного аналізу отриманих даних.....	35
РОЗДІЛ 3	37
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	37
3.1. Характеристика спонтанного рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові клінічно здорових осіб	37
3.2. Характеристика радіаційно-індукованого рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові клінічно здорових осіб	40
3.3. Дослідження функціональної активності лімфоцитів крові при тест-опроміненні	43
3.4. Порівняльне вивчення впливу інозину та метформіну на частоту радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові здорових осіб.....	46
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	49
ВИСНОВКИ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54
ДОДАТКИ.....	62

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕРН – експозиційна репарація нуклеотидів

ЕРО – експозиційна репарація основ

ІВ – іонізуюче випромінення

ІР – іонізуюча радіація

ЛПК – лімфоцити периферичної крові

РІНГ – радіаційно індукована нестабільність геному

РМ – радіомітigators

ФГА – фітогемаглютинін

HR – гомологічна рекомбінація (**H**omologous **R**ecombination)

NHEJ – негомологічне кінцеве з'єднання (**N**on**H**omologous **E**nd-**J**oining)

ВСТУП

Широке впровадження нових технологій із використанням джерел іонізуючої радіації (ІР) в різні сфери життєдіяльності людини, розширення космічних досліджень, негативні наслідки Чорнобильської катастрофи та інших радіаційних інцидентів диктують необхідність подальшого пошуку, оцінки і скринінгу ефективності застосування радіопротекторних препаратів з профілактичною метою [1]. Актуальність досліджень у зазначеному напрямку обумовлена з'ясуванням механізмів та особливостей формування радіаційно-індукованої генетичної, у тому числі хромосомної, нестабільності радіочутливих соматичних клітин людини, радіаційного мутагенезу та канцерогенезу й виникненням віддалених променевих ускладнень.

У якості радіобіологічної основи для виконання таких завдань слугуватиме тест-система культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) з метафазним аналізом аберацій хромосом, використання якої дозволяє моделювати радіочутливість соматичних клітин людини за різних експериментальних умов, у т. ч. від дози опромінення, концентрації радіопротекторів тощо. В останній час увагу дослідників привертають захисні препарати – радіомітігатори, мішенню дії яких є клітини гематоімунної системи [2]. В цьому плані позитивно себе зарекомендували такі препарати, як беталейкін, індралін, інозин [3]. Однак, їх ефекти щодо захисту геному залишаються недостатньо з'ясованими [4].

В останній час з'явилися поодинокі роботи, які свідчать, що метформін (Мф), відомий як анти-діабетичний препарат, може впливати на радіаційно-індуковану генетичну нестабільність клітин шляхом активації процесів репарації [5]. Метформін призначається більш ніж 120 мільйонам пацієнтів у всьому світі в якості лікування пацієнтів з діабетом 2-го типу. Препарат вважається безпечним, оскільки його дія на зниження рівня глюкози не супроводжується гіпоглікемією. Також було показано його антиапоптотичну

дію в мононуклеарах периферичної крові людини та встановлено його вплив на стимуляцію репаративних процесів, нормалізацію обміну ліпідів [6, 7].

Враховуючи вищезазначене, метою роботи є порівняння радіомітігуючих ефектів інозину та метформіну на хромосомному рівні лімфоцитів крові умовно здорових осіб (дослідження *in vitro*).

Для досягнення мети було сформульовані наступні завдання:

1. Опрацювати тест-систему лімфоцитів периферичної крові людини та засвоїти метод цитогенетичного (метафазного) аналізу аберацій хромосом.
2. Визначити кількісні та якісні показники спонтанного рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові умовно здорових осіб.
3. Визначити кількісні та якісні показники радіаційно-індукованих аберацій хромосом при тест-опроміненні культур лімфоцитів крові в залежності від дози опромінення.
4. Охарактеризувати дозові криві для різних цитогенетичних показників із залученням математичної моделі лінійної регресії.
5. В порівняльному аспекті дослідити радіомітігуючі властивості препаратів інозину та метформіну в залежності від їх концентрації та величини дози тест-опромінення.

Об'єкт дослідження – формування аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини.

Предмет дослідження – радіомітігуючі властивості препаратів інозину та метформіну на рівні хромосом лімфоцитів крові.

Методи дослідження – напівмікрометод культивування лімфоцитів периферичної крові, метод метафазного аналізу.

Наукове дослідження було проведене на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, у відділі біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання. Робота виконувалась під керівництвом професора, доктора біологічних наук, завідувача відділу Дьоміної Емілії Анатоліївни.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Іонізуюча радіація (ІР) є глобальним техногенним і екологічним фактором, дія якого навіть в малих (надфонових) дозах може обумовити нестабільність геному людини, репродуктивні проблеми, розвиток соматичних, і в тому числі онкологічних патологій [8]. Широке впровадження ядерної технології в промисловість, сільське господарство, медицину та науку неминуче веде до підвищення канцерогенного ризику. У зв'язку з неухильним збільшенням віддалених негативних медико-біологічних наслідків Чорнобильської катастрофи дослідницький інтерес вітчизняних та зарубіжних фахівців у галузі радіобіології та радіаційної медицини зосередився на поглибленому вивченні мутагенних та канцерогенних ефектів ІР [9].

Радіоекологічна криза в країні підіймає важливу проблему збереження здоров'я населення в умовах безперервного хронічного низькоінтенсивного (внутрішнього за рахунок радіонуклідів) опромінення в постчорнобильський період. Результати численних досліджень свідчать про те, що в сучасному світі вплив ІР на організм людини практично неминучий. У зв'язку з цим захист геному, тканин, органів і організму в цілому для осіб, що піддаються опроміненню в силу різних ситуаційних обставин, є пріоритетом сучасної радіобіології та радіаційної медицини [10].

1.1. Механізми утворення радіаційно-індукованих аберацій хромосом

Найбільш вразливою мішенню при дії ІР є генетичний апарат клітини [11]. У результаті прямої дії ІР відбувається низка його пошкоджень, а саме – пошкодження основ, втрата нуклеотидів, одноланцюгові і дволанцюгові розриви ДНК [12]. При утворенні односторонніх розривів, внаслідок

поглинання кванту енергії, зв'язок між молекулами руйнується лише в одному ланцюзі ДНК. На відміну від односторонніх, при подвійних розривах ДНК відбувається пошкодження в близьких ділянках обох ланцюгів, що є найбільш небезпечним для генетичного апарату клітини (рис. 1.1.), оскільки більшою мірою саме вони призводять до утворення хромосомних аберацій [13–15]. Двониткові розриви ДНК визнані найбільш критичним радіаційно-індукованим пошкодженням клітин, оскільки їх виникнення зумовлює перебудови в геномі, репродуктивну загибель клітин. Саме двониткові розриви ДНК є найбільш ранніми з передканцерогенних подій у клітині, а також променевими маркерами [16].

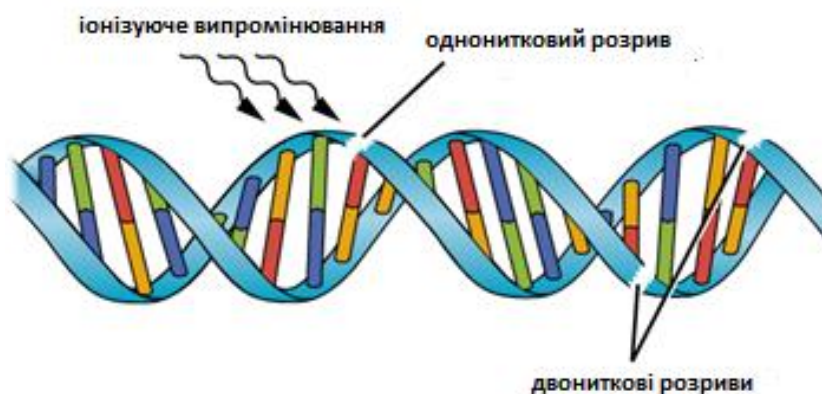


Рис 1.1. Схематичне зображення утворення односторонніх та двониткових розривів ДНК внаслідок опромінення [13]

Варто відмітити, що пошкодження основ та односторонні розриви, які виникають в ДНК, кількісно перевищують двониткові розриви та утворюються в 50 разів частіше. Пошкодження основ та утворення односторонніх розривів відбувається не тільки при дії радіації, а й при здійсненні процесів метаболізму. Підраховано, що щодня в кожній клітині утворюється близько 100 тисяч таких дефектів. Односторонні розриви призводять до деградації одиночних тяжів ДНК, і репаруються, в основному, протягом декількох хвилин після опромінення, і тільки незначна частина – протягом кількох годин. Припускається, що при опроміненні виникають не

тільки одностричкові розриви, аналогічні спонтанним, але додатково можуть утворюватися «комплексні», при яких у «скелеті» ДНК поруч знаходяться декілька розірваних кінців. Такі одностричкові розриви репаруються набагато складніше в порівнянні зі спонтанними [17].

У клітинах ссавців, що культивуються, близько 70% одностричкових розривів видаляється під час швидкої репарації протягом 3-5 хв інкубації при 37°C, в той час як інші одностричкові воз'єднуються протягом 90 хв. Тимоти, лімфоцити та гепатоцити, опромінені в складі цілісного організму, репарують одностричкові розриви з нижчою швидкістю [18].

Поряд з репарацією одностричкових розривів встановлена можливість репарації двостричкових розривів ДНК. При опроміненні одна частина двостричкових є наслідком одночасного розриву двох ниток ДНК в одному місці й виникнення таких розривів пропорційно дозі радіації. Утворення більше 90% таких двостричкових розривів характерно при опроміненні в діапазоні малих доз. Інша частина двостричкових розривів утворюється внаслідок попадання двох незалежних одностричкових розривів у певну область ДНК; кількість розривів у такому випадку зростає пропорційно квадрату дози опромінення і характерно для дії великих доз радіації [17, 18].

Пошкодження ДНК, що виникають під дією ІР, можуть бути відредаговані системами репарації. В разі неефективності процесів репарації або ж “помилкової” репарації в клітині запускається апоптоз і клітина гине. Невідрепаровані двостричкові розриви ДНК є летальними через втрату ділянок хромосом у наступному мітозі, що обумовлює втрату генетичного матеріалу – десятків або сотень генів [19, 20].

У відновленні радіаційно-індукованих пошкоджень беруть участь різні системи репарацій. При відновленні пошкодження основ застосовується експозиційна репарація основ (ЕРО) [21], втрата нуклеотидів ліквідується за допомогою експозиційної репарації нуклеотидів (ЕРН) [22]. Одноланцюгові розриви відновлюються одноланцюговою репарацією одного ланцюга (single-strand break repair), що включає в себе ЕРО та ЕРН [23]. Найскладнішими є

шляхи відновлення двониткових розривів, оскільки неправильно відремонтований або не відремонтований двонитковий розрив призводить до аберацій у клітині, яка вижила. Існує два механізми репарації двониткових розривів: гомологічна рекомбінація (HR) та негомологічне кінцеве з'єднання (NHEJ) [24]. Різниця між HR та NHEJ полягає в тому, що для відновлення двониткового розриву при HR необхідна шаблонна молекула, яка має містити гомологічну послідовність, а для NHEJ такої молекули не потрібно. NHEJ слугує основним шляхом репарації в клітинах ссавців, але саме він є основним чинником виникнення генних мутацій, делецій, хромосомних аберацій [11, 12, 25]. Накопичуючись в ході клітинних циклів, хромосомні аберації спричиняють геномну нестабільність та, як зазначено вище, можуть ініціювати злоякісну трансформацію клітин [11].

1.2. Класифікація радіаційно-індукованих аберацій хромосом

Хромосомні аберації лежать в основі багатьох радіобіологічних теорій та мають багато практичних застосувань у галузях біологічної дозиметрії, клінічної цитогенетики та моніторингу навколишнього середовища [26]. Структурною основою для класифікації аберацій (перебудов) хромосом є дві хроматиди. Розрізняють хромосомний та хроматидний типи аберацій, фрагменти та обміни, стабільні та нестабільні, симетричні та асиметричні, міжхромосомні та внутрішньхромосомні [11, 27].

Хромосомний тип аберацій характеризується утворенням розривів та з'єднань, що відбуваються на обох сестринських хроматидах у будь-якому локусі. Хроматидний тип – розриви та з'єднання проходять на одній із сестринських хроматид в будь-якому локусі. Таке розділення важливе, оскільки утворення певних видів аберацій залежить від агента, що індукує хромосомні аберації. Специфічним маркером впливу ІВ є хромосомні аберації, а саме дицентрики та рівень транслокацій [28, 29].

Хромосомний та хроматидний типи аберацій поділяються на прості (фрагменти) та обмінні аберації. Прості аберації хроматидного типу виникають за рахунок розриву на одному плечі хроматиди й мають назву пропуск (ізопропуск). До простих аберацій хромосомного типу належать парні (ацентричні) фрагменти, що утворюються внаслідок розривів двох сестринських хроматид. Парні фрагменти можуть бути різної величини та розташовуються паралельно один до одного. Ацентричні фрагменти зазвичай виникають як наслідок утворення ацентричних кілець чи дицентриків, але також вони можуть утворюватися незалежно [30, 31].

Обмінні аберації є результатом “повторного з’єднання” двох розривів, відповідно до того, де розриви розташовані та як об’єднані стосовно плечей хромосом, розрізняють внутрішньохромосомні й міжхромосомні, внутрішньохроматидні та міжхроматидні. Обмінні аберації також поділяються на симетричні та асиметричні [28, 32].

Хромосомні обміни покладені в основу методу біологічної дозиметрії. Саме цей тип аберацій індексується безпосередньо під впливом ІВ, він є показником для визначення дози опромінення, яку отримав організм. Визначається рівень дицентриків, використовуючи найбільш чутливий – стандартний метод аналізу дицентричних хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини [33]. Характерне утворення хромосомних аберацій у фазах G_0 (стадія спокою) та G_1 (пресинтетична стадія) клітинного циклу при дії ІР. До міжхромосомних асиметричних обмінів належать дицентрики та поліцентрики. До міжхромосомних симетричних відносяться реципрокні транслокації. До внутрішньохромосомних асиметричних аберацій належать центричні та ацентричні кільця та інтерстиціальні делеції. До внутрішньохромосомних симетричних аберацій відносяться перицентричні інверсії та парацентричні інверсії [26, 28]. Всі хромосомні аберації зображені на Рис. 1.2.

Хромосомний тип				
Обмінні				Прості
	Міжхромосомні	Внутрішньохромосомні		
Симетричні	 Дицентрик	 Центричне кільце	 Інтерстиальна делеція	 Парний фрагмент
Асиметричні	 Реципрокна транслокація	 Перецентрична інверсія	 Парацентрична інверсія	

Рис.1.2. Схематичне зображення хромосомних аберацій [26].

Аберації хроматидного типу в людини слугують маркерами мутагенної дії хімічних та деяких біологічних агентів *in vivo*. Під дією ІВ хроматидні аберації спостерігаються лише на певних стадіях клітинного циклу. До аберацій хроматидного типу відносяться фрагменти та хроматидні обміни (симетричні та асиметричні) [34].

Нестабільні аберації – пошкодження хромосом, що порушують нормальний поділ клітин, перешкоджають мітозу, можуть зумовити мітотичну загибель клітини. В клітинному циклі існують контрольні точки перевірки «checkpoints». При виникненні пошкоджень, що утворюються під дією ІР, в точках чекпойнту відбуваються їх виявлення. У випадку виявлення нестабільної аберації клітина гине [32]. В результаті загибелі, клітини з такими абераціями елюмінуються з часом із популяції диференційованих клітин. До нестабільних аберацій відносяться ацентрики (одиначні й парні ацентричні фрагменти, ацентричні кільця), поліцентрики, центричні кільця. В більшості випадків вони виявляються в найближчі терміни після опромінення організму [11].

Стабільні аберації – пошкодження хромосом, що не перешкоджають процесу клітинного ділення, успадковуються дочірніми клітинами й можуть

зберігатися протягом життя індивіда. До них відносяться реципрокні хромосомні транслокації, інверсії, інсерції. Оскільки перебудови такого типу не елімінуються під час процесу клітинного поділу й накопичуються при тривалій дії ІР, то вони виявляються у віддалених термінах після опромінення людини й використовуються для біологічної дозиметрії. Окрім того, стабільні хромосомні аберації, що виникають у статевих клітинах, можуть передаватися із покоління в покоління (трансгенераційний ефект). Стабільні хромосомні аберації в ЛПК людини виявляються за допомогою традиційного рутинного забарвлювання й при застосуванні диференціального G-забарвлювання [11, 29, 33].

Встановлено, що в геномі людини завжди наявний невисокий рівень спонтанних аберацій – такі, що виникають в результаті дії на геном зовнішніх та внутрішніх чинників. У *Homo sapiens* найбільш низький рівень спонтанних аберацій виявлено в лімфоцитах. Цей рівень може змінюватися в залежності від віку людини, екологічного стану довкілля, способу життя людини [11, 35].

Радіаційно-індуковані аберації є раннім маркером пізніх негативних ефектів – таких як трансформація та загибель клітин. Визначення рівня хромосомних аберацій, що спостерігаються при першому мітозі після опромінення, є показовим методом виявлення наявності чи відсутності ефектів після опромінення [36]. Визначення ступеню пошкодження генетичного апарату є важливим прогностичним показником для визначення ризику виникнення радіаційно-індукованої онкології [37].

1.3. Тест-система лімфоцитів периферичної крові як біоіндикатор опромінення організму людини

Тест-система лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) з наступним метафазним аналізом аберацій хромосом – унікальний об'єкт для виконання цитогенетичних обстежень опромінених осіб, а також для оцінки ефективності радіозахисні препаратів. Дослідження виконуються з використанням Т-лімфоцитів, які характеризуються високою радіочутливістю і відіграють важливу роль в імунних процесах. Дана тест-система рекомендована міжнародними організаціями ВООЗ, МАГАТЕ, НКДАР ООН в якості «золотого» стандарту для проведення цитогенетичних досліджень [12, 38, 39].

Якщо звернутися до історії розвитку цитогенетики, то ще видатний німецький вчений Пауль Ерліх звернув особливу увагу на те, що імунна система здатна активно взаємодіяти з пухлинними клітинами [40]. З точки зору сучасного рівня знань, які накопичило людство в ході багатьох десятиліть, основною задачею імунітету була і залишається підтримка генетичної стабільності власних клітин. Вона забезпечується шляхом своєчасного виявлення та знищення генетично змінених або трансформованих клітин організму, та захистом від чужорідних агентів (вірусів та бактерій). Іншими словами, це забезпечує протиінфекційний та протипухлинний захист організму протягом його життя [11, 41].

Здатність імунних клітин відрізнити «своїх» від «чужих» контролюється клітинами лімфоцитарної ланки гемопоезу, які складають основу специфічного імунітету, а саме, Т- і В-лімфоцитами. Особливу увагу варто зосередити на Т-лімфоцитах, адже вони відіграють основну роль у протипухлинному захисті організму [41]. Отже, з огляду на вищезазначене, спонтанні та індуковані аберації хромосом в Т-лімфоцитах крові надають змогу оцінювати їх стан з позицій як гемопоетичної, так й імунної систем.

Варто зазначити, що приналежність Т-лімфоцитів до складу мікрооточення пухлин не завжди позитивно впливає на протипухлинний імунітет. Одним із таких негативних аспектів є здатність активувати PD-1. PD-1 (programmed death) – рецептор, трансмембранний протеїн Т-лімфоцитів, при активації якого відбувається загибель цих клітин [42]. На відміну від PD-1, ліганди PD-L1/2 експресуються клітинами різних органів. Відповідно до цього, в злоякісних новоутвореннях під дією гіпоксії відбувається гіперекспресія PD-L1/2 і в результаті цього пригнічується імунна відповідь. Також експресія PD-L1/2 сприяє активації PD-1 та запуску процесу апоптозу Т-лімфоцитів [42–44].

За сучасною класифікацією, яка оцінює вразливість до дії радіаційного випромінювання, проліферативний потенціал та диференційованість, ЛПК людини належать до першого, тобто вегетативно інтермітотичного класу клітин [41]. Слід зауважити, що висока радіочутливість у поєднанні з високим рівнем диференціювання роблять ЛПК винятком з правила Бергоньє-Трибондо [45]. Це означає, що перебуваючи в стані спокою G_0 , про що свідчить низький рівень синтезу ДНК, вони володіють високою радіочутливістю [41, 46]

Висока мобільність лімфоцитів у кров'яному руслі та розподілення лімфатичних вузлів по всьому організму створює єдину систему, яка дозволяє свідчити про радіочутливість організму людини в цілому. За даними деяких дослідників [11, 47], така система забезпечується не лише внаслідок безпосереднього опромінення ЛПК, але й завдяки наявності ефекту свідка.

Особливою перевагою для використання в радіобіологічних дослідженнях ЛПК є їх доступність, простота отримання та висока концентрація в популяції клітин (в 1 мл крові $1-3 \cdot 10^6$ малих лімфоцитів) [11]. Високий рівень радіочутливості хромосом лімфоцитів у порівнянні з хромосомами інших клітин вказує на те, що рівень індукованих аберацій переважає над рівнем спонтанних хромосомних аберацій. Встановлено, що

рівень спонтанних аберацій в ЛПК невисокий порівняно з іншими клітинами та залежить від віку досліджуваних осіб [48].

У деяких популяціях лімфоцитів радіаційно-індуковані аберації хромосом здатні зберігатися до кількох років, при тому що середня тривалість життя таких популяцій може тривати від 15 днів до 5 років. Кількість у крові таких лімфоцитів досягає 66%, а в лімфі до 90% [49]. У хворих, які завершили курси променевої терапії, при цитогенетичному обстеженні в різні терміни спостерігалось зниження кількості хромосомних аберацій в ЛПК у 2,4 разу, а зменшення числа абераційних клітин у 2 рази, протягом перших п'яти років [11]. У подальшому часі рівень кількості аберацій у таких хворих залишався у 5-6 разів вищим у порівнянні з фоновими показниками [49, 50].

Однією з характерних особливостей ЛПК є їх синхронність, адже в периферичній крові вони знаходяться в стадії спокою (G_0) [51]. Ще однією характеристикою є здатність до бласттрансформації під дією мітогену, такого як фітогемаглютинін (ФГА) [52]. Вище зазначене дає можливість створювати стандартизовані методи культивування, фіксації та отримання цитогенетичних препаратів, що є важливим для лабораторної діагностики.

Таким чином, дана тест-система дозволяє охарактеризувати стан генетичного апарату соматичних клітин людини на основі аналізу частоти та спектру аберацій хромосом за різних умов опромінення та радіомодифікації [18].

Методика, за допомогою якої здійснюється культивування ЛПК, є базовою, але модифікованою на сучасний лад із першоджерел, авторство яких належить Р. Moorhead, D. Hungerford та іншим [53, 54]. Для отримання препаратів метафазних хромосом лімфоцитів людини і аналізу першого мітозу після опромінення проводиться короткотривале (48-51 годин) культивування зразків гепаринізованої крові, з використанням спеціального мітогену (ФГА) для стимуляції Т-лімфоцитів [11].

Таким чином, висока радіочутливість хромосом ЛПК, низький та відносно стабільний рівень спонтанних аберацій у цих клітинах, здатність до акумуляції цитогенетичних порушень протягом певного періоду часу, природня синхронізація перед початком культивування та інше характеризують тест-систему ЛПК як найкращу основу для дослідження мутагенності фізичних та хімічних факторів оточуючого середовища, в тому числі ІР. Більш того, саме аберації хромосомного типу притаманні для дії іонізуючих випромінювань і тому визнані променевими маркерами. Це надає змогу диференціювати променеві ефекти від дії хімічних та біологічних факторів, які індукують аберації хроматидного типу.

1.4. Радіаційнозахисні засоби: класифікація та механізми дії

Залучення значних контингентів населення з метою ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС, в основному репродуктивного віку, які піддаються пролонгованому і фракційному опроміненню, сприяло активізації наукового і практичного інтересу до пошуку засобів корекції (мінімізації) радіаційно-індукованих порушень. Тому захист геному, тканин, органів і організму в цілому осіб, що піддаються в силу різних обставин опроміненню, залишається однією з актуальних проблем клінічної радіобіології та радіаційної медицини [55].

На основі механізму поліваріантної дії радіопротекторів їх умовно поділяють на три групи. Перша група – це препарати, які здійснюють захисний ефект на клітинному рівні шляхом нейтралізації "кисневого ефекту". Радіпротектори другої групи здійснюють захисні ефекти на системному рівні шляхом прискорення процесів післярадіаційного відновлення радіочутливих тканин. Їх ефект відбувається за рахунок активації ряду прозапальних сигнальних шляхів та збільшення секреції

гемопоестичних факторів росту. До третьої групи відносять радіомодулятори, дія яких обумовлена, в основному, модуляцією експресії генів [56, 57].

До більш вразливих мішеней, що зазнають впливу ІР, належить геном людини. З цієї позиції радіаційно-захисні агенти поділяють на антимутагени та ко-мутагени. У свою чергу антимутагени, які здатні знижувати частоту мутацій, поділяються на речовини, які блокують дію автомутагенів, що виникають в клітинах в процесі метаболізму, як наприклад, білок каталаза, що руйнує перекис водню, перешкоджаючи мутагенній дії; речовини, що послаблюють дію мутагенів, в тому числі й ІВ – це сульфгідрильні сполуки, деякі спирти, карбонатні солі; ферменти, які безпосередньо беруть участь в репарації радіаційно-індукованих пошкоджених структур. Ко-мутагени – речовини, здатні суттєво модифікувати дію мутагенів оточуючого середовища, в тому числі іонізуюче випромінювання [55, 56].

Формування радіопротекторних ефектів здійснюється на фоні пригнічення процесів вільнорадикального окиснення. Однак в умовах довготривалого опромінення в низьких дозах більшість радіопротекторів є токсичними. За даних випадків застосовуються адаптогени – речовини, які підвищують загальну неспецифічну стійкість та стимулюють захисні антиокислювальні системи організму. В ролі таких агентів виступають стимулятори кровотворення, естрогени, імуномодулятори [55].

Згідно з часовими рамками використання радіозахисних агентів, розрізняють препарати, які вводяться до опромінення організму, та ті, що вводять після опромінення. Перша група (профілактичні речовини) складається з двох класів речовин. Перший клас – це речовини, що надходять в організм за короткий термін до опромінення та діють короткочасно (індралін, аміфостин). Другий клас речовин вводиться в організм до опромінення за кілька діб, вони мають стимулювати радіорезистентність й діяти протягом довгого часу [55, 57].

В залежності від цільового призначення радіаційнозахисного засобу до нього вимагаються різні характеристики, які мають включати в себе

ефективність, тривалість захисної дії, токсичність та переносимість у разі одноразового та повторних використань, можливість застосування препарату під дією ІВ різної якості та широкого діапазону доз, можливість та адекватні умови зберігання.

Останнім часом увага дослідників акцентується на радіомітігаторах (РМ), вектор дії яких пов'язаний з клітинами гематоїмунної системи. РМ – хімічні або біологічні активні агенти, які послаблюють шкідливу дію іонізуючого випромінювання (ІВ) на клітини критичних систем організму [58]. Це стосується клітин гематоїмунної системи, в тому числі Т-лімфоцитів людини. В праці В.І. Лезеги та співавторів [2] наведена сучасна класифікація РМ, призначених для попередження або зниження складності відстрочених та віддалених променевих наслідків, а також наведені перелік і коротка характеристика найбільш перспективних препаратів цього ряду. За визначенням зазначених авторів, РМ – це протипроменеві засоби, що підвищують резистентність клітин і тканин через прискорення (оптимізацію) процесів їх пострадіаційної репарації. Слід зазначити, що РМ раніше відносили до різних класів протипроменевих засобів, але при цьому всі вони характеризуються подібним кінцевим ефектом [2, 55, 58].

До радіомітігаторів відносять гормональні препарати стероїдної структури та їх нестероїдні аналоги; ад'юванти імунологічних реакцій (вакцини, ендотоксини, полісахариди, полінуклеотиди і т. ін.); цитокіни (фактор некрозу пухлин, ростові фактори, інтерферони та ін.); імунорегуляторні пептиди (наприклад, тималін, тимоген, тактивін, тимоптин тощо). Механізм протипроменевого ефекту перерахованих сполук пов'язаний із їхньою здатністю прискорювати процеси пострадіаційної регенерації клітин кровотворної системи [59–61].

Якщо в системі захисту організму від гострого опромінення в сублетальних і летальних дозах основна увага приділяється синтетичним сполукам [62] та цитокінам [63], то при опроміненні в малих дозах перевага надається препаратам природного походження [2].

Також зріс дослідницький інтерес радіобіологів до протипроменевої дії цитокінів, які регулюють ріст, диференціювання, функціональну активність і радіорезистентність клітин. Захисна дія цитокінів визначається їх гемо- та імуностимулюючою активністю, а також здатністю підвищувати ендогенний фон радіорезистентності, посилювати протипухлинну відповідь організму. До них відносять інтерлейкіни, які здатні підтримувати високу радіорезистентність організму людини протягом тривалого періоду [55, 64].

Перспективними засобами профілактики променевих уражень визнані органічні сполуки селену (наприклад, селенотетрацистеїн), через малу токсичність. Антиоксидантний механізм їх дії характерний для формування всіх біологічних ефектів селену і реалізується селеновмісними білками. Результати епідеміологічних досліджень показали, що в селенодефіцитних регіонах частота онкологічних захворювань істотно вища. Ведеться пошук і апробація селеновмісних сполук з протипухлинною активністю в нетоксичних дозах [64, 65].

В експериментальних дослідженнях встановлено, що препарат аміфостин блокує ефект свідка, а також відновлює функції білка p53 [66], і таким чином мінімізує рівень стохастичних (канцерогенних) ефектів малих доз ІР.

Важливо відзначити, що дія більшості радіопротекторів характеризується виразністю побічних реакцій (порушення гемодинаміки, гіпертермія, загальне нездужання і т. ін.). Цих небажаних ефектів позбавлені РМ-імуномодулятори. Дослідженнями показано [67], що дезоксинат, що отримується з осетрових риб, в даний час використовується при лікуванні гіпо- і апластичних станів кровотворної системи, які виникають внаслідок опромінення людини в діапазоні високих доз. Серед кістковомозкових радіомітігаторов особливою ефективністю відрізняються цитокіні-поліпептиди, які продукуються гемопоетичними клітинами, що регулюють їх ріст і диференціювання, а також функціональну активність, наприклад, інтерлейкін-1 β [61, 67].

Радіомітігуючою активністю володіють багато антиоксидантів. Перевага віддається рослинним екстрактам, що включають фенольні сполуки, оскільки вони малотоксичні й швидко метаболізуються в організмі людини. Серед препаратів, що знижують ризик виникнення віддалених стохастичних ефектів в опромінених тканинах, перспективним є ресвератрол – спиртовий екстракт, отриманий з червоного винограду. Його застосування знижує вихід радіаційно-індукованих аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку [67, 68].

Найбільш адекватно відповідає вимогам, що пред'являються до сучасних РМ, нуклеозид пурину – інозин (Ін), комерційна назва – рибоксин. Це препарат природного походження, нетоксичний, використовується в кардіологічній практиці як стимулятор метаболічних процесів, попередник синтезу АТФ і нуклеотидів, що підтримує енергетичний баланс у різних тканинах [69]. Встановлено гемостимулюючі, імунотропні та антиоксидантні властивості даного препарату, а також його здатність нормалізувати кількість природних клітин-кілерів, стимулювати ферментативні процеси репарації радіаційних пошкоджень ДНК [70–72]. Передбачається, що вплив інозину на процеси репарації в опромінених клітинах перешкоджає утворенню внутрішньо- і міжхромосомних обмінів. В даний час інозин оцінюють як ефективний засіб тривалого підвищення радіорезистентності організму людини [70, 71]. Іншими словами, інозин володіє поліваріантним характером механізму дії, зумовлюючи широкий спектр біологічної активності, в тому числі підвищення загальної радіорезистентності і мобілізацію захисних ресурсів організму.

Науково-дослідний і практичний інтерес має також препарат метформін (Мф), що застосовується в медичній практиці при лікуванні діабету 2 типу. Препарат отримують із багаторічної рослини *Galega officinalis*. Це гідрофільна сполука, що майже не метаболізується в організмі людини та екскретується нирками. За своїми властивостями метформін має широкий спектр ефектів. Терапевтичний рівень метформіну в плазмі становить 0,5-2,5

мг/л (3-15 μM). Період його напіввиведення складає від 1,74 до 7,3 годин [6, 73].

Потрапивши в клітину, метформін спеціалізується на гальмуванні першого комплексу переносу електронів дихального ланцюга.

Метформін може впливати на радіаційно-індуковану генетичну нестабільність клітин. Встановлено, що вплив метформіну сприяє активації механізмів репарації, тим самим зменшуючи пошкодження ДНК. Шляхом підвищення антиоксидантних властивостей та інгібування НАДФН-оксидази, циклооксигенази-2 відбувається обмеження активності макрофагів та запальних реакцій. Під дією метформіну відбувається зниження кількості вільних радикалів, що накопичуються в результаті дії ІВ [6].

В експериментальних дослідженнях [5] встановлено радіозахисний ефект метформіну при введенні його опроміненим мишам, а саме: покращення виживаності, зменшення частоти мікроядер в клітинах кісткового мозку тварин.

Таким чином, на основі огляду даних літератури пріоритетним залишається подальше більш поглиблене вивчення особливостей радіомітігуючої активності інозину, а також дослідження властивостей метформіну в якості потенційного радіомодифікатора на хромосомному рівні імунокомпетентних клітин організму людини.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА
РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Основним матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові (Т-лімфоцити) здорових донорів, мешканців міста Київ. Донори, які брали участь у дослідженні, заперечували будь-який контакти з джерелами ІВ у минулому.

Витратні матеріали:

1. Ємності для дезінфекцій;
2. Розчин для дезінфекції використаних матеріалів;
3. Розчини для дезінфекції рук;
4. Розчин для дезінфекції поверхонь;
5. Спирт етиловий 70%;
6. Серветки одноразові гладкі неткані;
7. Рукавички медичні, латексні чи нітрилові;
8. Рукавички гумові для миття скелець;
9. Стерильні одноразові шприци – 2 мл;
10. Стерильні одноразові шприци – 5 мл;
11. Шприци інсулінові;
12. Стерильні фільтрувальні насадки для шприців;
13. Стерильні пробірки для центрифугування градуйовані на 14 мл PLASTILAB (Ліван);
14. Вакутайнери з гепариновим напиленням («F.L. Medical», Italy);
15. Стерильні пастерівські піпетки;
16. Стерильні серологічні піпетки;

17. Предметні скельця Super Frost;

18. Миючий засіб для скелець;

19. Носики для дозаторів на 1 мл;

- Носики для дозаторів на 5 мл;

- Підставки для носиків

20. Фільтрувальний папір;

21. Стерильні бинти;

22. Стерильна вата.

Лабораторний посуд:

23. Скляна мірна колба, об'єм 100 мл;

24. Скляна мірна колба, об'єм 200 мл;

25. Скляний флакон з кришкою для розчину KCl;

26. Скляний флакон з кришкою для розчину фіксатора;

27. Вимірювальний циліндр (500 мл) для дистильованої води;

28. Вимірювальний циліндр (1000 мл) для дистильованої води;

29. Стакан хімічний для робочого 5 Н розчину HCl;

30. Стакан хімічний для робочого розчину барвника Романовського-

Гімза.

31. Чашки Петрі;

32. Пінцети;

33. Шпатель.

Реактиви:

34. Культуральне середовище "RPMI-1640" (Gibco, USA);

35. Фітогемаглютинін («PHA-M, Gibco-Invitrogen», USA);

36. Гентаміцин – розчин ін'єкційний 4 % (Здоров'я Україна);

37. Колцемід "KaryoMax" (Gibco, USA);

38. 0,55 М хлорид калію (KCl);

39. Спирт етиловий 96 % (C₂H₅OH);

40. Крижана оцтова кислота (CH₃COOH);
41. Барвник Гімза (Sigma, USA);
42. Імерсійна олія;
43. Фізіологічний розчин;
44. Наважки препарату метформін;
45. Дистильована вода.

Лабораторне обладнання:

46. Ламінарний бокс («БиоВитрум», Росія);
47. Термостат («МІЗМА", Україна);
48. Центрифуга для пробірок («Elmi», Латвія);
49. CO₂ інкубатор (MCO-19AIC, Sanyo Panasonic)
50. Електронні ваги («ТВЕС», Україна);
51. Вортекс («Elmi», Латвія);
52. Витяжна шафа («ТТЕСТ», Україна);
53. Морозильна камера («Atlant», Білорусь) ;
54. Холодильна камера («Atlant», Білорусь);
55. Дозатори («Biotech НТІ» USA);
56. Газовий пальник ;
57. Мікроскоп («ZEISS» Germany);
58. Електронна піпетка («Biotech НТІ» USA);
59. Контейнер для медичних відходів;
60. Штативи для пробірок;
61. Кристалізатор для забарвлення хромосом;
62. Сумка-бокс з хладогеном;
63. Рентгенівська експериментальна установка «РУМ-17».

2.2. Методи дослідження

Дослідження виконувались у відповідності до загальноприйнятих етичних норм та принципів, визнаних Гельсінською декларацією Всесвітньої Медичної Асоціації (2008 р.), яка передбачає інформовану згоду донорів на участь у наукових дослідженнях [39].

2.2.1. Підготовка предметних скелець. Попередньо перед використанням предметні скельця мають бути знежирені та охолоджені, оскільки такий стан скелець забезпечує рівномірне розташування метафаз по периметру скельця. Цей етап дуже важливий, оскільки саме таке розташування метафазних пластинок сприяє швидкому аналізу цитогенетичних препаратів та свідчить про їх якість.

Предметні скельця Super Frost знежирювали миючим засобом, потім промивали водогінною водою, після чого промивали дистильованою водою, і за 30 хвилин до використання охолоджували в холодильній камері.

Ще одним ефективним методом охолодження скелець є їх заморожування. Після того, як скельця були знежирені та промиті водою, їх струшували від зайвої вологи та розташовували рівномірно на чашки Петрі, уникаючи накладань скелець одне на одне, й поміщали в морозильну камеру.

2.2.2. Приготування розчинів. Розчини бажано використовувати протягом одного робочого дня, тому необхідну кількість розчинів підготовлювали безпосередньо перед проведенням експерименту.

Фіксатор: змішували метиловий спирт із крижаною оцтовою кислотою у співвідношенні 3:1. Готували безпосередньо перед фіксацією. Охолоджували при -32°C протягом 30 хв перед використанням.

Розчин гіпотонії: 550 мг KCl зважували на електронних вагах. Наважку KCl розчиняли в 100 мл дистильованої води в герметично закритій посудині. Отриманий розчин нагрівали в термостаті до температури 37°C .

Робочий розчин барвника Гімза. Барвник Романовського-Гімзи знаходиться у вигляді концентрату, до складу якого входить суміш азуру, еозину й метиленового синього. Для приготування робочого розчину на 1 мл дистильованої води (рН 7,0-7,2) додається 1-2 краплі концентрату. Для приготування робочого розчину на 10 мл: до 8 мл дистильованої води (рН 7,0-7,2) додається 2 мл концентрату. Барвник використовується протягом одного робочого дня.

2.2.3. Дослідження дії радіомітігаторів. Підготовка розчину метформіну проводилась *ex tempore*. Наважку препарату метформін розводили фізіологічним розчином до бажаної концентрації (2 та 20 ммоль). Після розведення розчин метформіну набирали в стерильний шприц, на шприц одягали фільтрувальну насадку та відфільтровували. Відфільтрований розчин вносили по 50 мкл в досліджувані зразки. Препарат інозин вводили в культуру ЛПК в терапевтичній концентрації: 0,01 мг/мл крові.

2.2.4. Розфасовка фітогемаглютиніну. ФГА – це широко досліджуваний лектин, мітоген Т-лімфоцитів крові людини [52]. Реактив зберігається в морозильній камері за температури -32....-34°C. Для уникнення частих розморозок та контамінації попередньо ФГА розфасовують в стерильних умовах в інсулінові шприци (по 10 мл). Розфасований ФГА поміщали в морозильну камеру за температури -32...-34°C. Перед початком культивування необхідну кількість ФГА нагрівали до кімнатної температури [74].

2.2.5. Забір крові. Забір венозної крові проводився медичними сестрами в маніпуляційному кабінеті клінічного відділення [75]. Від кожного донора за допомогою вакуумної системи набирали не менше 6 мл венозної периферичної крові та розміщали у вакутайнер з гепариновим напиленням, ретельно перемішували для запобігання згортання крові.

Вакутайнери маркували особистим номером пацієнта та датою забору крові. В обліковий журнал вносили наступні відомості про пацієнта: прізвище, ім'я, по-батькові, вік, перенесені та супутні захворювання. Також в

обліковий журнал вносили відомості про наступне: а) чи мав пацієнт раніше контакти з джерелами ІВ, б) чи перебував на радіаційно-забруднених територіях, в) інформацію про те, як пацієнт переніс процедуру забору крові.

Гепаринізована кров зберігалась в холодильній камері за температури $+4...+8^{\circ}\text{C}$. Найоптимальніший варіант доставки зразків – одразу після взяття. Час доставки впливає на кількість життєздатних ЛПК – чим довше набрана кров стоїть, тим більша ймовірність зниження кількості лімфоцитів. Транспортування здійснюється в сумці-боксі з холодогеном за умов $+4...+8^{\circ}\text{C}$ [76].

2.2.6. Культивування лімфоцитів периферичної крові.

Експеримент проводили згідно з міжнародним стандартним протоколом (ІАЕА, 2011). Для культивування ЛПК застосовувався напівмікрометод з деякими модифікаціями [12, 27].

Перед початком культивування та після його проведення приміщення та ламінарний бокс стерилізували ультрафіолетовими променями. Всі поверхні дезінфікували для підтримання їх стерильності.

Попередньо підготовлені стерильні пробірки для кожного пацієнта в необхідній кількості маркували відповідно до наукового завдання. Перед опроміненням в кожен пробірку вносили по 0,5 мл периферичної крові. Після опромінення в кожен ємність стерильним носиком на 5 мл додавали по 4,5 мл живильного середовища RPMI-164. Цю маніпуляцію проводили без занурення носика у пробірки – для запобігання контамінації зразків. Середовище перед початком культивування нагрівали до кімнатної температури та необхідний об'єм середовища відливали в окремі флакони. Після цього до кожної пробірки додавали по 0,1 мл ФГА. Зразки перемішували з середовищем та виставляли в штатив, опромінювали та після опромінення одразу поміщали у CO_2 інкубатор з 5% CO_2 під кутом нахилу 45° і температурою $+37^{\circ}\text{C}$ на 52 години.

За час культивування середовище необхідно перемішувати (раз на добу) та спостерігати за ростом лімфоцитів. Оптимальною температурою для

культивування вважається $+37^{\circ}\text{C}$. Це обумовлено тим, що при підвищенні температури культивування до $+39\dots40^{\circ}\text{C}$ спостерігається підвищення мітотичної активності у 3 – 4 рази, а пік мітозів зміщується на 41 – 44 годину культивування [76].

Використані піпетки, пробірки, рукавички переносили у ємності для знезараження, а залишок венозної крові відставляли у холодильну камеру до кінця експерименту. Після завершення експерименту (після фіксації та отримання препаратів) вакутайнери з залишками периферичної крові підлягали знезараженню та утилізації.

2.2.7. Умови опромінення культури лімфоцитів периферичної крові людини. Тест-опромінення культури ЛПК здійснювали на базі аналітичного обладнання Національного інституту раку МОЗ України – на рентгенівській установці «РУМ-17». Потужність дози становила $0,89$ Гр/хв., напруга – 180 кВ, фільтр Cu ($0,5$ мм), діапазон доз $0,5$ Гр, 1 Гр, 2 Гр, 3 Гр.

Перед опроміненням перевіряли маркування зразків та розставляли їх відповідно до доз опромінення. Опромінення здійснювали на стадії клітинного циклу G_0 , після чого пробірки з культурою клітин одразу поміщали у CO_2 -інкубатор.

Всі маніпуляції – час опромінення, тривалість опромінення та дату опромінення фіксували у відведеному для цього журналі.

2.2.8. Фіксація культури лімфоцитів периферичної крові людини. На сорок дев'ятій годині культивування за три години до фіксації у культуру вводили 59 мкл колхіцину, і далі інкубували ще 30 хвилин. Після завершення культивування пробірки центрифугували при $1,5$ тис. об./хв протягом 9 хв. Потім відбирали надосадову рідину до 1 мл, перемішували осад на вортексі та додавали 8 мл гіпотонічного розчину, знову ставили інкубуватися в термостат на 23 хвилин. Після інкубування з гіпотонічним розчином пробірки центрифугували при $1,5$ тис об./хв протягом 9 хв, відбирали надосадову рідину до 1 мл, осад перемішували.

До досліджуваних зразків нестерильною піпеткою Пастера додавали 18 крапель розчину фіксатора, перемішували, центрифугували при 1,5 тис об./хв протягом 9 хв, відбирали надосадову рідину до 1-0,5 мл, осад обережно перемішували.

Потім до отриманого осаду по стінці кожної пробірки обережно додавали 5 мл розчин фіксатора, перемішували, центрифугували при 1,5 тис об./хв протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину до 1-0,5 мл, осад ретельно, але не збовтуючи, перемішували.

По стінці пробірки додавали 5 мл розчину фіксатора, перемішували, центрифугували при 1,5 тис об./хв протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину до 1-0,5 мл, осад ретельно перемішували.

Останній раз до осаду різким струменем додавали 5 мл розчину фіксатора, перемішували на вортексі, центрифугували при 1,5 тис об./хв протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину до 0,5 мл, осад перемішували, і поміщали на 20 хвилин в холодильну камеру, потім центрифугували при 1,5 тис. об./хв протягом 5 хв, і відбирали максимально надосадову рідину.

2.2.9. Приготування препаратів. Розкрапування на предметне скло відбувалося наступним чином. Отриману суміш клітин в розчині фіксатора ресуспендували з самплером (або збиванням на вортексі), причому ця процедура виконується швидко, набравши фіксатор і виливши назад його з натиском. Потім відбирали 76 мкл розчину фіксатора та клітин, залишали самплер в пробірці. Охолоджене скло 10 разів струшували від води, знизу протирали серветкою від зайвої води і швидко розкрапували досліджуваний зразок, чекали кілька секунд поки не зникне поверхневий натяг води на склі та з'явиться білий відблиск. Як тільки це відбулося, висушували препарат над полум'ям горілки. Готовий препарат забарвлювали та аналізували.

Ще одним методом приготування цитогенетичних препаратів є розкрапування суспензії клітин на заморожені скельця. Перед розкрапуванням скельця діставали із морозильної камери, попередньо ресуспендовану суспензію клітин рівномірним шаром розкрапували над

склом на відстані піднятої вгору руки на охолоджене предметне скло і висушували над полум'ям горілки. Наступного дня після висихання предметні скельця забарвлювали.

Кожне предметне скельце уважно маркували, переносячи позначки із пробірок на відповідну зону предметного скельця. На кожного пацієнта розкрапували по кілька (3-4 штуки) препарати. Пробірки із зафіксованими клітинами зберігали в холодильнику до завершення всіх етапів експерименту. Після отримання остаточних даних та завершення експерименту пробірки із залишками суспензії клітин знезаражували та утилізували.

2.2.10. Забарвлення цитогенетичних препаратів. Для забарвлення цитогенетичних препаратів використовували традиційний метод – рівномірне забарвлення. Цей метод ідеально підходить для підрахунку кількості хромосом на метафазній пластинці, їх групового індексу та морфології. Дуже важливо, що за допомогою цього методу виявляють променеві маркери – дицентричні та кільцеві хромосоми, великі транслокації [77].

Препарати забарвлювали виготовленим в той же день барвником Романовського-Гімза (2%) на стандартному фосфатному буфері. Забарвлення цитогенетичних препаратів проводили у спеціальній ємності (кристалізаторі) протягом 13-16 хв за кімнатної температури. Зміна тривалості забарвлення залежала від часу, який пройшов після моменту приготування барвника, та особливостей метафазних пластинок пацієнта.

Після забарвлення препарат промивали дистильованою водою з метою видалення надлишку барвника. Зразки висушували до повного висихання препаратів та аналізували.

2.2.11. Аналіз цитогенетичних препаратів. Метафазний аналіз препаратів хромосом проводили з використанням світлового мікроскопа. Підбір метафазних пластинок проводили при збільшенні $\times 10$ та $\times 20$, що дозволяло оцінити густину розкрапування, кількість хромосомних пластинок

в полі зору та якість забарвлення. Для оцінки якості метафазних пластинок та проведення подальшого аналізу використовували об'єктив з збільшенням $\times 40$. Безпосередній аналіз цитогенетичних препаратів здійснюють під світловим мікроскопом із використанням імерсійного об'єктиву ($\times 100$) у середовищі імерсійної олії.

До критеріїв відбору метафазних пластинок для аналізу належали наступні вимоги: рівномірний розкид, мінімальне число накладень хромосом однієї на одну, оптимальний ступінь спіралізації, відсутність метафазних пластинок, які щільно лежать поряд. Для кожного зразка аналізували 200 хромосомних пластинок у середньому.

На першому етапі аналізу проводили підрахунок кількості хромосом – нормальна метафазна пластинка має містити тільки 46 ± 1 хромосоми (Рис.2.1.).

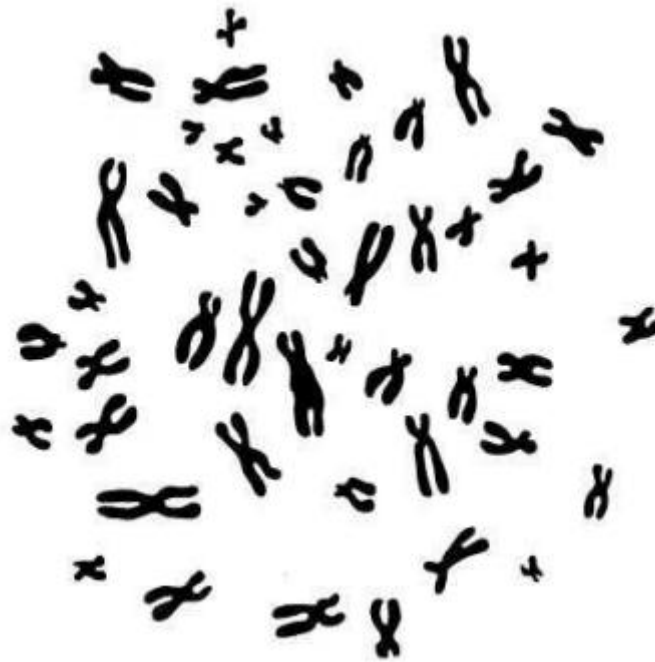


Рис.2.1. Мікрофотографія метафазної пластинки. Нормальний каріотип, 46 хромосом (збільшення x 1000).

На приготовлених рівномірно забарвлених препаратах форма хромосом визначається положенням первинної перетяжки, яка розділяє кожен хромосом на два плеча. В області первинної перетяжки знаходиться центромера – щільне тільце, до якого прикріплюються мікротрубочки веретена поділу під час мітозу або мейозу. В залежності від розташування первинної перетяжки і центромери, визначають хромосоми: метацентричні (центромера розташована практично посередині – обидва плеча хромосоми є рівними), субметацентричні (центромера змістилася із середнього положення – визначають коротке (p) і довге (q) плечі) і акроцентричні (центромера зміщена в кінцеве положення) [76, 77].

Другим етапом після підрахунку кількості хромосом в метафазній пластинці є кількісний та якісний аналіз аберацій хромосом. Для кожного зразка визначали спонтанний рівень аберацій та його зміни після дії ІР. Для

цього визначали частоту аберантних клітин (%), загальну частоту аберацій хромосом (на 100 аналізованих метафаз), перебудови хромосомного та хроматидного типу, фрагменти та обміни.

Типовий приклад променевого маркера (дицентрик із супроводжуючим парним фрагментом) наведений на рис.2.2. Абрації даного типу виникають в результаті обміну хромосомними фрагментами між двома різними хромосомами й характеризуються наявністю у одній аномальній хромосомі одразу двох або більше за кількістю центромерних ділянок. При підрахунку кількості хромосом дана структурна перебудова враховується як дві хромосоми.



Рис.2.2. Мікрофотографія метафазної пластинки лімфоцита периферичної крові людини: 1 – дицентрична хромосома; 2 – супроводжуючий парний фрагмент.

2.2.12. Оцінка проліферативного потенціалу лімфоцитів крові. Важливим показником цитогенетичного статусу клітин є оцінка їх проліферативної активності, яка при різних умовах радіомодифікації ефектів

дозволяє судити про процеси елімінації аберантних клітин, радіаційно-індукованої затримки мітозу, ступеня імунокомпетентності Т-лімфоцитів і т. ін. [78]. Висока чутливість Т-лімфоцитів до опромінення дозволяє використовувати культуру даних клітин як інформативну клітинну модель для оцінки їх проліферативного потенціалу. З метою оцінки цього потенціалу в заданих експериментальних умовах визначали мітотичний індекс ФГА-стимульованих лімфоцитів на підставі формули:

$$MI = (M_1/M_2) \times 1000 \text{ ‰}$$

де M_1 - кількість клітин в стадії метафази, M_2 - загальна кількість бластних клітин.

З метою зменшення величини стандартної помилки аналізували не менш як 2000 клітин на одне спостереження [78].

Дотримання обґрунтованих і стандартизованих лабораторних умов культивування клітин гематоімунної системи (Т-ліфоцитів) людини, їх тест-опромінення і термінів фіксації культури цих клітин, а також критеріїв метафазного аналізу аберацій хромосом є обов'язковим для отримання достовірних значень цитогенетичних показників.

2.2.13. Методи статистичного аналізу отриманих даних.

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних відносно мітотичної активності ЛПК в культурі проводили стандартними методами з використанням програми Excel [79].

Для апроксимальної залежності частоти аберацій від дози опромінення використовували математичну модель лінійної регресії:

$$Y = \alpha * D + \beta$$

де Y – кількість аберацій хромосом на 100 проаналізованих метафаз; α та β – параметри моделі обчислювання, які використовували за допомогою

методів найменших квадратів, α – лінійний параметр, β – квадратичний параметр, D – доза опромінення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика спонтанного рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові клінічно здорових осіб

Першочергово розглядали частоту та спектр спонтанних аберацій хромосом у соматичних клітинах людини – ЛПК, які є біоіндикаторами організму людини, тобто інтегральними показниками радіаційної дії. Формування спонтанної частоти аберацій зумовлено взаємодією мультифакторіальних ефектів та індивідуальних особливостей людини [35]. Спонтанна частота є варіабельним показником, за яким визначають не тільки мутагенність факторів навколишнього середовища, але й ефективність додаткової дії модифікаторів на геном людини. Спонтанний рівень хромосомних аберацій в лімфоцитах крові людини не є жорстко фіксованою величиною. На зміни рівня генетичних перебудов впливають такі фактори як вік, фізіологічний стан організму та інше. Об'єктивна оцінка спонтанного рівня аберацій в ЛПК залежить від модифікації умов культивування клітин (наприклад культурального середовища, тощо), фіксації та приготування цитогенетичних препаратів [80, 81]. Тому при плануванні та проведенні цитогенетичних досліджень ми використовували власні дані стосовно кількісних та якісних показників спонтанного рівня аберацій в ЛПК групи обстеження.

У табл. 3.1 представлено середньогрупові значення зареєстрованих типів аберацій в інтактних ЛПК обстежених нами 10 осіб. Загальна частота хромосомних перебудов не перевищувала 3,0 на 100 клітин, що в середньому складало $1,5 \pm 0,27$ аберацій на 100 клітин. Як правило, одна абераційна клітина містила одну хромосомну перебудову.

Таблиця 3.1

Частота та спектр спонтанних аберацій хромосом в обстеженій групі клінічно здорових осіб

Цитогенетичний показник	Середньогрупові значення на 100 метафаз	Мінімум	Максимум	Стандартне відхилення	Стандартна похибка
Аберантні метафази	1,5	0	4	1,23	0,37
Загальна частота аберацій хромосом	1,5	0	4	1,23	0,37
Сума аберацій хроматидного типу	1,2	0	3	0,9	0,28
Сума аберацій хромосомного типу	0,3	0	1	0,54	0,16
Дицентрики	0	0	0	0	0
Кільцеві хромосоми	0	0	0	0	0

Таким чином, отримані середньогрупові значення спонтанного рівня аберацій в лімфоцитах крові клінічно здорових осіб групи обстежених не перевищують значення середньопопуляційного, описаного в літературі [34] та значно нижчі за верхню границю норми даного показника (3%).

Для порівняння, за даними більшості проведених досліджень [34, 35, 82] спонтанна частота аберацій в людини досить низька та складає в середньому 1,2-1,7%, причому більш ніж у 90% випадків частота аберацій коливається від 1 до 2 аберацій на 100 клітин.

Було встановлено, що найбільш поширеним типом спонтанних аберацій є структурні пошкодження хроматидного типу, в основному делеції, що свідчить про генетичну нестабільність клітин. Якщо за даними попередніх робіт відношення кількості аберацій хроматидного типу до хромосомного складає 1,5, то в нашому дослідженні воно вже становить 4,0, тобто виявлено більш виразне переважання хроматидних пошкоджень над хромосомними в порівнянні із середньопопуляційними показниками.

Поясненням до отримання такого спектру спонтанного хромосомного мутагенезу може слугувати час проведення досліджень. Оскільки обстеження донорів проводилося наприкінці весни, то передбачається можлива стимуляція мутагенних ефектів за рахунок білкової та вітамінної недостатності в раціоні обстежених осіб, а також зниженням імункомпетентності Т-лімфоцитів, яка пов'язана з процесами репарації генетичних структур [80].

Аберацій обмінного типу, а саме дицентричних та кільцевих хромосом, що визнані променевими маркерами, у спектрі обстежених осіб не виявлено.

Індивідуальні розбіжності спонтанного рівня аберацій формувалися за рахунок пошкоджень хроматидного типу, а саме, делецій.

Отримана характеристика спонтанного рівня аберацій хромосом в ЛПК донорів дозволяє об'єктивізувати не тільки генетичні ефекти опромінення, а й дію радіомодифікаторів.

3.2. Характеристика радіаційно-індукованого рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові клінічно здорових осіб

На репрезентативному експериментальному матеріалі – культурі ЛПК 10 умовно здорових донорів, при тест-опроміненні зразків крові в діапазоні доз 0,1-1,0 Грей (Гр), досліджено якісні та кількісні показники аберацій хромосом.

Аналіз спектру радіаційно-індукованих аберацій хромосом показав, що при найменшій дозі опромінення (0,1 Гр) відношення аберацій хромосомного типу до хроматидного становило 1,0, а з підвищенням дози змістилося в бік аберацій хромосомного типу й при дозі 1,0 Гр становило вже 1,6. Найбільш демонстративно ця закономірність виявлялася при аналізі дицентриків (променевих маркерів), рівень яких в діапазоні 0,1-1,0 Гр збільшувався у 18 разів. Це підтверджує більш інтенсивний темп утворення обмінних аберацій з підвищенням променевого навантаження на геном та свідчить про те, що при опроміненні ЛПК людини в G_0 періоді мітотичного циклу найбільш дозозалежними цитогенетичними показниками є дицентричні хромосоми (рис.2.2). Причому навіть в області малих доз (0,1-0,5 Гр) їх рівень з підвищенням дози зростає в 4,2 рази. Отримані аномальні дозові залежності виходу аберацій хромосом при тест-опроміненні в зазначеному діапазоні доз культури ЛПК донорів наведено в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Частота та спектр радіаційно-індукованих аберацій хромосом в обстеженій групі клінічно здорових осіб

Цитогенетичний показник на 100 метафаз	Доза, Гр					
	0	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0
Частота абераційних клітин %	1,1±0,4	6,0±1,6	7,0±1,6	7,5±1	10,9±1,4	17,4±1,5
Загальна частота абераційних хромосом	1,1±0,36	6,06±1,6	7,06±1,6	7,76±1,1	11,13±1,4	18,06±1,8
Сума аберацій хромосомного типу	0,3	2,99	3,26	4,16	5,23	11,4
Дицентрики	0	6,3	0,5	0,9	1,3	5,4
Центричні кільця	0	0,09	0,11	0,1	0,5	0,2
Сума аберацій хроматидного типу	0,8	3,07	3,8	3,6	5,9	7,2

Починаючи з дози 0,1 Гр, спостерігається утворення дозозалежної ділянки, яка зберігається при підвищенні дози опромінення до 0,3 Гр. При подальшому підвищенні величини дози опромінення (від 0,5 і вище) частота аберацій хромосом лінійно зростає. Характеристика дозових залежностей головних цитогенетичних показників (абераційні метафази, загальна кількість аберацій хромосом, дицентрики) апроксимується за допомогою лінійної моделі та визначена для кожного донора окремо.

Залежності цитогенетичних ефектів від дози опромінення, що визначені з використанням вказаної моделі та її розрахованих коефіцієнтів,

представлена в додатку А. У всіх випадках значення лінійного члена рівняння α перевищувало значення квадратичного члена β (в багатьох випадках він мав від'ємні значення).

З підвищенням променевого навантаження на геном соматичних клітин відмічається більш інтенсивний темп утворення аберацій обмінного типу, в тому числі променевих маркерів. Одним із можливих пояснень цього феномену є відома гіпотеза Лі Д.Е. [36] про утворення обмінних аберацій хромосом внаслідок максимального наближення ушкоджених ділянок хромосом. З підвищенням дози опромінення зростає число іонізуючих треків, відповідно до цього й кількість пошкоджень. За таких обставин утворення обмінів пов'язано з просторовим взаємовідношенням хромосомних пошкоджень. Результати нашої роботи свідчать про користь зазначеної гіпотези.

В цілому, дослідниками зроблено висновок, що вихід аберацій в діапазоні малих (надфонових) доз ІР підпорядковується більш складному, ніж лінійний, закону, а саме, немонотонному з дозозалежною ділянкою (плато), межі якої остаточно не визначені. Невизначеність розташування плато в діапазоні доз до 0,5 Гр концентрує зусилля генетиків на подальше вивчення таких питань, в тому числі механізмів формування "плато". Вони й можуть впливати на характер дозових кривих для різних показників радіаційно-індукованого хромосомного мутагенезу. У зв'язку з цим, доцільним являється визначення параметрів розташування дозозалежної ділянки на кривій при лабораторних дослідженнях ефективності радіомодифікаторів. В нашому дослідженні плато розташоване на ділянці 0,1-0,3 Гр.

3.3. Дослідження функціональної активності лімфоцитів крові при тест-опроміненні

Відомо, що ЛПК (Т-лімфоцити) людини здійснюють імунний контроль за антигенною сталістю внутрішнього середовища організму, а здатність клітин до бласттрансформації показує їх функціональну активність [41]. Виходячи з цього, паралельно з основними завданнями роботи ми проаналізували залежність мітотичної активності ЛПК обстежених осіб від дози тест-опромінення. Аналіз отриманих нами даних свідчить про наявність залежності мітотичної активності Т-лімфоцитів від дози тестуючого опромінення. Зображення, отримане під час аналізу мітотичної активності опромінених ЛПК людини, показано на рис.3.1.

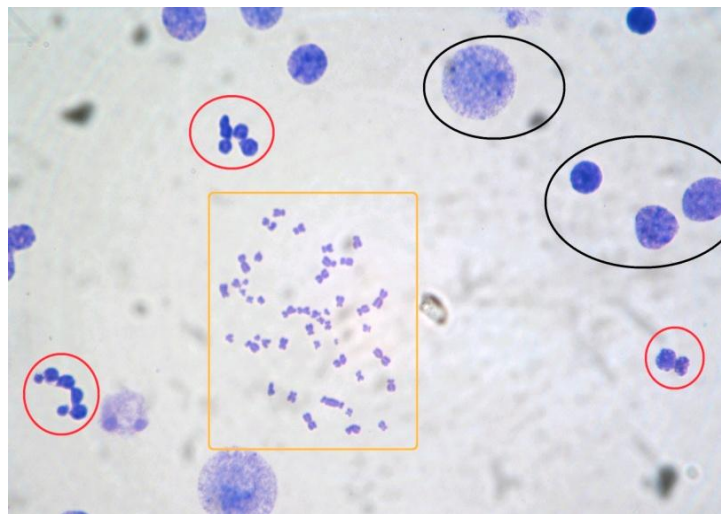


Рис. 3.1. Аналіз мітотичної активності опромінених ЛПК людини (мікрофото зб. x 400).

Цитогенетичний препарат: чорні кола – ядра, аналізовані як бласти; червоні кола – не аналізовані ядра (що не вступили в реакцію бласттрансформації); прямокутник – метафазна пластинка.

Нами було досліджено контрольний рівень мітотичної активності інтактних (не опромінених) ЛПК. Показано, що середній показник проліферативної активності лімфоцитів умовно здорових осіб складав $58,5 \pm 2,8\%$, що відповідає сучасним даним, що стосуються цього питання [11]. Результати, отримані при рентгенівському тест-опроміненні ЛПК в діапазоні доз 0,5-3,0 Гр, вказані на рис.3.2.

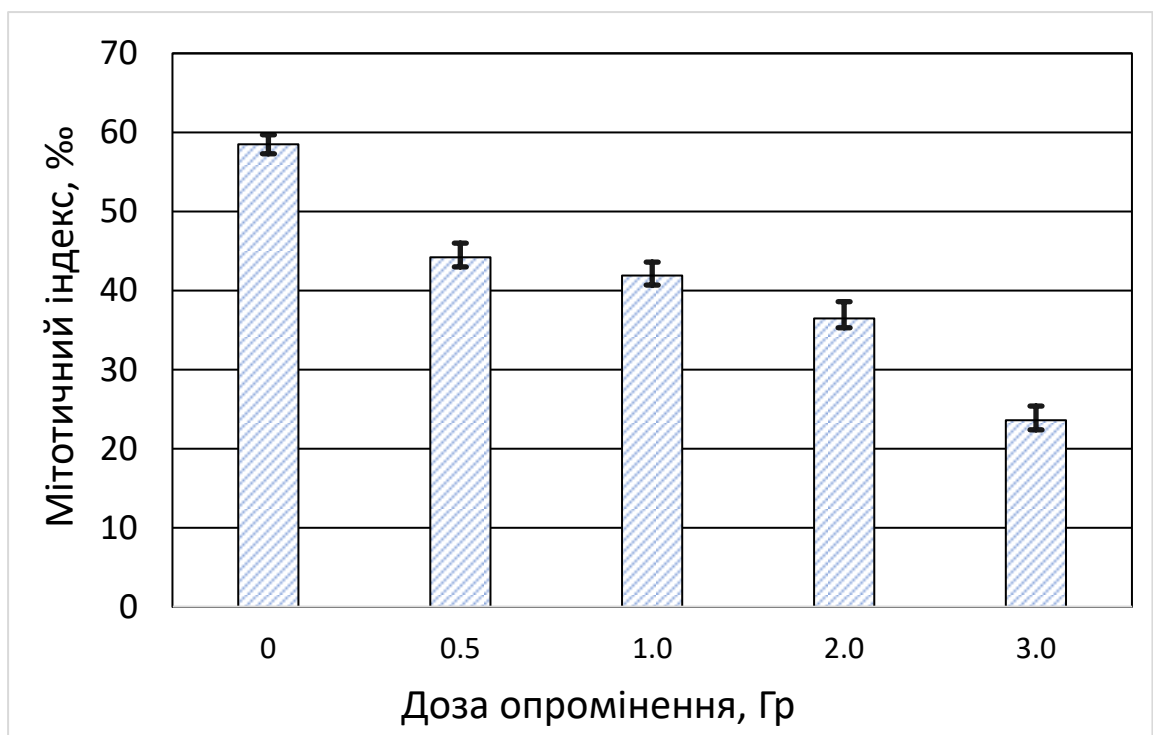


Рис. 3.2. Дослідження проліферативної активності опромінених *in vitro* лімфоцитів умовно здорових осіб в діапазоні доз 0,5-3,0 Гр.

Спостерігається дозозалежне пригнічення мітотичної активності клітин у всьому дослідженому діапазоні доз у порівнянні з контрольними значеннями показника: 0,5 Гр – в 1,3 разу; 1,0 Гр – в 1,4 разу; 2 Гр – в 1,6 разу; 3,0 Гр – в 2,3 разу. Таким чином, отримані дані відповідають основним положенням класичної радіобіології, відображаючи радіаційно-індуковану імунодепресію «індикаторних» клітин – Т-лімфоцитів.

Підсумовуючи отримані дані стосовно закономірностей утворення аберацій хромосом в соматичних клітинах умовно здорових осіб, можна зробити наступні узагальнення:

- підтверджено, що ЛПК крові людини як модель для виконання радіаційно-генетичних досліджень, а також оцінки ефективності радіомодифікаторів, відповідає вимогам, що пред'являються міжнародними організаціями МКДАР ООН, ВООЗ та МАГАТЕ до таких робіт [12, 38, 39];
- при цьому в обстеженій групі клінічно здорових осіб спонтанний рівень аберацій хромосом не перевищує значень середньопопуляційних показників;
- аналіз спектру радіаційно-індукованих аберацій хромосом показав, що при опроміненні культури ЛПК донорів (G_0 період мітотичного циклу) відношення аберацій хромосомного та хроматидного типів становить 1, а з підвищенням дози зміщується в бік хромосомного і при опроміненні в дозі 1,0 Гр дорівнює 1,6;
- при тестуючому опроміненні культури ЛПК умовно здорових осіб спостерігається аномальна форма дозової кривої із формуванням плато в діапазоні 0,1-0,3 Гр для різних цитогенетичних показників; надалі з підвищенням дози вихід радіаційно-індукованих аберацій відповідає для всіх обстежених лінійній залежності.

Отримані дані слугують підґрунтям для подальшого вивчення впливу препаратів з потенційними радіомітігуючими властивостями на хромосомному рівні імунокомпетентних клітин людини Т-лімфоцитів крові.

3.4. Порівняльне вивчення впливу інозину та метформіну на частоту радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові здорових осіб

В цьому підрозділі представлена експериментальна апробація активних речовин – радіомітigatorів, що здатні мінімізувати або подолати негативні ефекти ІР у широкому діапазоні доз, враховуючи опромінення в малих (надфонових) дозах, шляхом підвищення резистентності геному та активації захисних систем організму.

В якості радіомітigatorа-антиоксиданта виділено рибоксин (інозин), який попередньо пропонувався в якості засобу для збільшення радіорезистентності клітин, які піддавалися тривалій дії опромінення. В даному дослідженні ми вивчали радіомітigatorючу активність цього препарату на геном імунокомпетентних клітин (Т-лімфоцитів крові) в залежності від його концентрації та дози опромінення. Нами підтверджено його радіомітigatorючу дію на хромосомному рівні Т-лімфоцитів крові донорів.

В порівнянні з інозином досліджували проліферативну дію метформіну в залежності від його концентрації та дози опромінення в Т-лімфоцитах здорових донорів (рис 3.3).

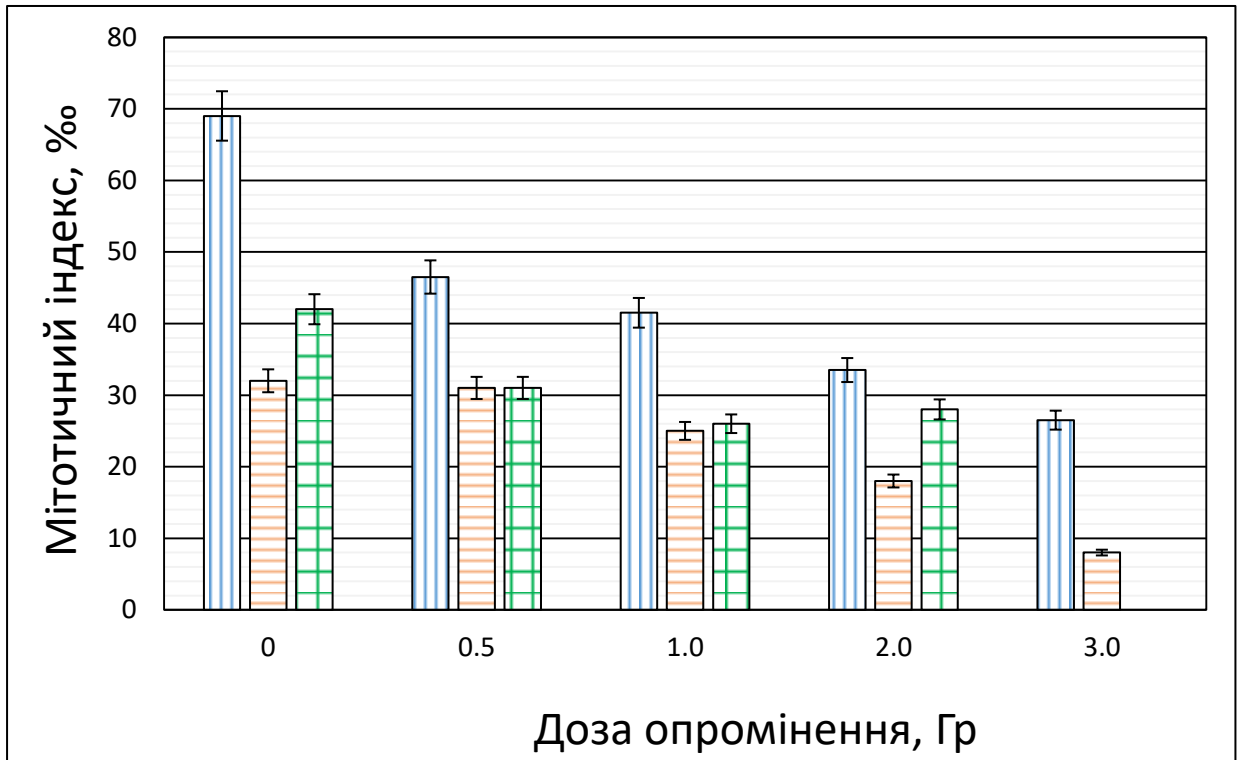





Рис. 3.3. Дослідження впливу метформіну на проліферативну активність опромінених *in vitro* лімфоцитів крові умовно здорових осіб.

Примітки:  – неопромінений контроль;  – вплив метформіну з концентрацією 2 µМ;  – вплив метформіну з концентрацією 20 µМ.

Як випливає з даних, представлених на рис. 3.3, мітотичний індекс в культурі неопромінених лімфоцитів становить $69,0 \pm 1,2$ ‰. Це узгоджується, як зазначено в розділі 3.3, з даними сучасної літератури. Тест-опромінення клітин пригнічує їх мітотичну активність в залежності від дози опромінення.

При додаванні в культуру клітин препарату метформін в концентрації, наближеній до значення терапевтичної, – 2 µМ з очікуваним радіомітігуючим ефектом, отримали зворотний ефект: зниження мітотичної активності опромінених клітин у всьому дослідженому діапазоні доз. Цей ефект найбільш виражений при концентрації метформіну 20 µМ і дозі опромінення

3,0 Гр. Отримані дані свідчать про зниження мітотичної активності неопромінених клітин. Цей факт підтверджується даними про антипроліферативну дію метформіну на пухлинні клітини хворих на колоректальний рак [83].

Таким чином, попередньо отримані нами дані не свідчать на користь радіомітігуючої дії препарату метформін. Відповідно, існує необхідність подальших комплексних досліджень в цьому напрямку.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Одним із способів оцінки ефективності дії модифікаторів на геном людини та мутагенності факторів навколишнього середовища є визначення спонтанної частоти аберацій. Спонтанний рівень хромосомних аберацій в лімфоцитах крові є варіабельним значенням, яке залежить від віку людини, фізіологічного стану організму та інших факторів [35]. Оцінка спонтанного рівня аберацій в ЛПК залежить від модифікації умов культивування клітин, фіксації та приготування цитогенетичних препаратів [80]. При плануванні та проведенні цитогенетичних досліджень використання лише попередніх даних стосовно спонтанного рівня аберацій не є доцільним.

В радіаційній цитогенетиці існує положення, що дослідження спонтанного рівня аберацій хромосом є необхідною складовою кожної цитогенетичної лабораторії для вивчення ефективності та токсичності радіомодифікаторів. Тому найбільш доцільним підходом до виконання досліджень в даному напрямку є такі умови, коли терміни лабораторних робіт в основній та контрольній групах збігаються. Таким чином отримання власних даних стосовно кількісних та якісних показників спонтанного рівня аберацій в ЛПК групи обстежених є важливим [84].

Отримані нами середньогрупові значення спонтанного рівня аберацій в лімфоцитах крові клінічно здорових осіб групи обстежених не перевищують значення середньопопуляційного. Аберацій обмінного типу, а саме дицентричних та кільцевих хромосом, у спектрі обстежених осіб не було виявлено.

Геномна нестабільність характеризується аномальним збільшення мутацій в геномі, які в результаті можуть бути успадкованими. Цитотоксичні агенти, такі як неіонізуюче та іонізуюче випромінювання, вільні радикали та метали, атакують захисні механізми геному шляхом генерації активних форм кисню та пошкодження ядерної чи мітохондріальної ДНК, клітинних

мембран та ферментів [85]. Ці процеси сприяють геномній нестабільності та спричиняють утворення радіаційно-індукованих аберацій. Встановлено, що радіаційно індукованим абераціями є дицентричні хромосоми (аберації обмінного типу), кількість яких зростає в залежності від променевого навантаження на геном соматичних клітин. Підтверджено, що зі збільшенням дози опромінення вихід радіаційно-індукованих аберацій вимірюється з допомогою лінійної моделі.

Важливим показником цитогенетичного статусу лімфоцитів є оцінка їх проліферативної активності, яка при різних умовах опромінення дозволяє давати судження про процеси елімінації абераційних клітин, радіаційно-індукованої затримки мітозу в залежності від дози опромінення і стадії клітинного циклу; ступеня імунокомпетентності Т-лімфоцитів, відповідальних за протипухлинну резистентність організму людини, а також про характер радіомодифікації ефектів [84]. На жаль, робіт, в яких інтерпретація радіаційно-індукованих ефектів доповнювалася б інформацією про проліферативний потенціал клітин, мало. Як відомо [78], лімфоцити крові знаходяться в периферичному пулі на стадії G_0 клітинного циклу, тобто в стадії спокою, і тому є інертними клітинами. При взаємодії з мітогеном (в нашому дослідженні це фітогемаглютинін) лімфоцити активуються, в результаті чого відбувається ряд метаболічних змін, що обумовлюють реакцію бласттрансформації.

При вивченні радіомітігуючих властивостей речовин одним із ключових показників є дія досліджуваного препарату на мітотичну активність клітин. Останнім часом дослідники зосереджують свою увагу на препараті метформін. Препарат вважається безпечним, оскільки його дія на зниження рівня глюкози не супроводжується гіпоглікемією. Також було показано його антиапоптотичну дію в мононуклеарах периферичної крові людини та встановлено його вплив на стимуляцію репаративних процесів, нормалізацію обміну ліпідів [73, 86].

Передбачається, що цілеспрямоване застосування метформіну має сприяти постпроменевму відновленню тканин, що оточують пухлину, відповідно, має спостерігатися зниження побічних реакцій, що виникають внаслідок терапевтичного опромінення [87]. Проте отримані нами дані слугують причиною до подальшого дослідження властивостей метформіну як радіомітигатора. Вони свідчать про те, що наявність метформіну в неопромінених та опромінених клітинах знижує їх мітотичну активність.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьована тест-система лімфоцитів периферичної крові людини відповідно до стандартного міжнародного протоколу з деякими модифікаціями для виконання біодозиметрії/біоіндикації променевих уражень та оцінки ефективності радіомітігаторів.

2. Лімфоцити периферичної крові клінічно здорових донорів, як модель для проведення радіаційно-цитогенетичних досліджень, характеризується низьким рівнем структурних пошкоджень хромосом. Середня частота спонтанних хромосомних аберацій складає 0,01-0,02 на клітину та не перевищує значень середньопопуляційного показника.

3. При тестуючому опроміненні культури лімфоцитів периферичної крові умовно здорових осіб спостерігається аномальна форма дозової кривої із формуванням плато в діапазоні (0,1-0,3 Гр); надалі з підвищенням дози опромінення рівень радіаційно-індукованих аберацій відповідає лінійній залежності доза-ефект, що підтверджується значенням лінійного коефіцієнту моделі регресії.

4. Із підвищенням променевого навантаження на генетичний апарат лімфоцитів крові людини виявляється більш інтенсивний темп утворення аберацій обмінного типу, в тому числі променевих маркерів.

5. Мітотична активність лімфоцитів крові залежить від дози опромінення з підвищенням якої зростає пригнічуючий вплив іонізуючої радіації на проліферативний потенціал клітин.

6. На хромосомному рівні соматичних клітин людини підтверджено радіомітігуючі властивості препарату інозин за рахунок зниження кількості радіаційно-індукованих аберацій хромосом.

7. Вперше встановлено, що потенційний радіомодифікатор метформін впливає, «пригнічує» проліферативний потенціал лімфоцитів крові людини у всьому досліджуваному діапазоні доз (0,5-3,0 Гр) тест-опромінення.

Одержані результати є підґрунтям до подальшого порівняльного вивчення особливостей дії радіомітігаторів на хромосомний апарат лімфоцитів крові онкологічних хворих.

За матеріалами виконаного дослідження прийнято до друку одні тези.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Рождественский Л.М. Актуальные вопросы и исследования противолучевых средств . *Радиационная биология Радиоэкология* 2013; 53: 513–520.
- [2] Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Драчёв И.С. Радиомитигаторы: классификация, фармакологические свойства, перспективы применения. *Радиационная биология Радиоэкология* 2019; 161–169.
- [3] Б. Рождественский Л.М. Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения . *Радиационная биология Радиоэкология* 2017; 57: 117–135.
- [4] Сычева Л.П. и соавт. Антимутагенное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышах. *Радиационная биология Радиоэкология* 2019; 59: 388–393.
- [5] Abdullaev S, Minkabirova G, Karmanova E, et al. Metformin prolongs survival rate in mice and causes increased excretion of cell-free DNA in the urine of X-irradiated rats. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2018; 831: 13–18.
- [6] Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview. *Clinical Science* 2012; 122: 253–270.
- [7] Najafi M, Cheki M, Rezapoor S, et al. Metformin: Prevention of genomic instability and cancer: A review. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2018; 827: 1–8.
- [8] Дёмина Э.А. Радиогенный рак: эпидемиология и первичная профилактика. In: *Наукова думка*. 2010, p. 196.
- [9] Нац. докл. Украины. Двадцать пять лет Чернобыльской катастрофы. Безопасность будущего. 2011, p. 368.
- [10] Ryan JL. Ionizing radiation: The good, the bad, and the ugly. *Journal of*

- Investigative Dermatology* 2012; 132: 985–993.
- [11] Е.А, Демина, М.А., Пилинская, Ю.И., Петунин, Др. И. Радиационная цитогенетика. Русско-английский словарь-справочник. 2009, р. 366.
- [12] World Health Organization I. *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies*. Viena, <http://www-ns.iaea.org/standards/> (September 2011, accessed 2 March 2020).
- [13] Tindall KR, Stein J, Hutchinson F. Changes in DNA base sequence induced by gamma-ray mutagenesis of lambda phage and prophage. *Genetics* 1988; 118: 551–60.
- [14] Olive PL. The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiat Res* 1998; 150: S42.
- [15] Eken A, Aydın A, Erdem O, et al. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of hospital staff occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Toxicol Ind Health* 2010; 26: 273–280.
- [16] Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci* 2015; 8: 247–254.
- [17] Ярмоненко С.П., Вайнсон.А.А. Радиобиология человека и животных. 2004, р. 549.
- [18] Nakamura N. History of radiation genetics: light and darkness. *International Journal of Radiation Biology* 2019; 95: 999–1014.
- [19] Rydberg B. Radiation-induced DNA Damage and Chromatin Structure. *Acta Oncol (Madr)* 2009; 40: 682–685.
- [20] Mothersill C, Rusin A, Seymour C. Low doses and non-targeted effects in environmental radiation protection; where are we now and where should we go? *Environmental Research* 2017; 159: 484–490.
- [21] Liu Y, Prasad R, Beard WA, et al. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . *J Biol Chem* 2007; 282: 13532–13541.
- [22] Fuss JO, Cooper PK. DNA repair: Dynamic defenders against cancer and aging. *PLoS Biology* 2006; 4: 0899–0903.

- [23] Caldecott KW. DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell* 2003; 112: 7–10.
- [24] Jeggo PA, Löbrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 1192–1198.
- [25] Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 1297–1301.
- [26] Savage JRK. An Introduction to Chromosomal Aberrations. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*; 3. Epub ahead of print 1999. DOI: 10.4267/2042/37524.
- [27] IAEA General Conference. *IAEA Annual Report 2011*. 2011.
- [28] Savage JRK. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 1976; 13: 103–122.
- [29] Qian Q-Z, Cao X-K, Shen F-H, et al. Effects of ionising radiation on micronucleus formation and chromosomal aberrations in Chinese radiation workers. *Radiat Prot Dosimetry* 2016; 168: 197.
- [30] Mestres M, Caballin MR, Schmid E, et al. Analysis of α -particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes. *Int J Radiat Biol* 2004; 80: 737–744.
- [31] Benkhaled L, Barrios L, Mestres M, et al. Analysis of γ -rays induced chromosome aberrations: A fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 869–875.
- [32] Carrano A V. Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by x rays and fission neutrons: dependence on cell cycle stage. *Radiat Res* 1975; 63: 403–21.
- [33] Ryu TH, Kim JH, Kim JK. Chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Genome Integr*; 7. Epub ahead of print 1 January 2016. DOI: 10.4103/2041-9414.197172.
- [34] Дьоміна Е. А., Дружина М. О. РНМ. Індивідуальна радіочутливість

- людини. 2006, р. 126.
- [35] Н.М. Рябченко, Е.А. Дьоміна. Значення спонтанної та радіаційно індукованої частоти аберацій хромосом в оцінці індивідуальної радіаційної чутливості людини. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів* 2008; 6: 125–130.
- [36] Durante M, Formenti SC. Radiation-induced chromosomal aberrations and immunotherapy: Micronuclei, cytosolic DNA, and interferon-production pathway. *Front Oncol*; 8. Epub ahead of print 29 May 2018. DOI: 10.3389/fonc.2018.00192.
- [37] William B. Coleman GJ. The Molecular Basis of Human Cancer. 1993, р. 886.
- [38] United Nations Environment Programme., International Labour Organisation., World Health Organization. *Guidelines for the study of genetic effects in human populations*. World Health Organization, 1985.
- [39] Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86: 650–652.
- [40] Science History Institute. Paul Ehrlich. *Science History Institute* 2016; 345–348.
- [41] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and PW. Chapter 24. The Adaptive Immune System. In: *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. New York, 2002, pp. 786–902.
- [42] Філоненко КС; КІА; МАВ. PD-L1/2: прогностичне значення в онкології. *Онкологія* 2018; 2: 102–106.
- [43] Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33: 547–562.
- [44] Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, et al. Tumor microenvironment as a “game changer” in cancer radiotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*; 20. Epub ahead of print 1 July 2019. DOI: 10.3390/ijms20133212.
- [45] Vogin G, Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *Int J Radiat Biol* 2013; 89: 2–8.

- [46] Cooper GM. The Eukaryotic Cell Cycle. Washington: Sinauer Associates, 2000, p. 728.
- [47] Shemetun O V., Pilinska MA. Radiation-induced bystander effect. *Cytology and Genetics* 2007; 41: 66–71.
- [48] Ivanov B, Praskova L, Mileva M, et al. Spontaneous chromosomal aberration levels in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1978; 52: 421–426.
- [49] Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H, et al. Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1989; 211: 265–272.
- [50] Visfeldt J. Radiation-Induced Chromosome Aberrations: Persisting aberrations in long-term cultures from human skin irradiated in vivo. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.3109/02841866409134134.
- [51] Д.А Бази́ка, Г.В Кулі́ніч М. П. Радіаційна медицина. In: Видавництво Медицина (ed). 2013, p. 232.
- [52] Т. О. Кочубей ОВМЛІМ, О. О. Півень ЛЛЛ. ПроаПоПтичні властивості сумарного ПреПарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин людини 4BL. 2014.
- [53] Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613–616.
- [54] Hungerford DA. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL. *Biotech Histochem* 1965; 40: 333–338.
- [55] Э. А. Дёмина. Противолучевые средства: классификация и механизмы. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології* 2015; 20: 42–54.
- [56] Mun GI, Kim S, Choi E, et al. Pharmacology of natural radioprotectors. *Archives of Pharmacal Research* 2018; 41: 1033–1050.
- [57] Vasin M V. Comments on the mechanisms of action of radiation protective agents: Basis components and their polyvalence. *SpringerPlus* 2014; 3: 1–16.

- [58] Vasin VM. The classification of radiation protective agents as the reflection of the present state and development perspective, of current radiation pharmacology. *Radiatsionnaia Biol Radioecol Akad Nauk* 2013; 53: 459–467.
- [59] Shannon MF, Coles LS, Vadas MA, et al. Signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells.
- [60] Shu-Guang Wu, MiyamotoTadaaki. Radioprotection of the Intestinal Crypts of Mice by Recombinant Human Interleukin-1 α Radioprotection of the Intestinal Crypts of Mice by Recombinant Human Interleukin-1 α . *Radiat Res* 1990; 123: 112.
- [61] В.Г. Лебедев, Б.Б. Мороз, Ю.Б. Дешевой, et al. Исследование механизмов противолучевого действия ин-терлейкина-1 β на модели длительных культур костного мозга. *Радиационная биология Радиоэкология* 2002; 42: 60–64.
- [62] Васин М.В. Противолучевые лекарственные средства. 2010, р. 180.
- [63] Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. 2010, р. 216.
- [64] Гриневич Ю.А., Барабой В.А. Новообразовательный процесс и стрессовая патология. *Zdorov'ia*, 2006, р. 155.
- [65] Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology* 2003; 189: 1–20.
- [66] Kaukourakis M.I. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *Br J Radiol* 2012; 85: 313–330.
- [67] Чертков К.С. Лечение и профилактика острой лучевой болезни в условиях массового поражения. In: Л.А. Ильина (ed). 2001, р. 432.
- [68] Jagetia GC. Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2007; 40: 74–81.
- [69] Варганян Л.П., Вершинина С.Ф., Горнаева Г.Ф. Противоопухолевая и противолучевая эффективность рибоксина в эксперименте.

- Радиационная биология Радиоэкология* 1995; 208–208.
- [70] Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Зацепин В.В. Медицинская защита при радиационных авариях: некоторые итоги и уроки Чернобыльской катастрофы. *Радиационная биология Радиоэкология* 2011; 51: 70–75.
- [71] Легеза В.И. Иммунотропные свойства рибоксина в условиях радиационного воздействия. *Радиобиология* 1990; 30: 553.
- [72] Гудков С.В. Гуанозин и инозин (рибоксин). Антиоксидантные и радиозащитные свойства. 2011, р. 177.
- [73] Gong L, Goswami S, Giacomini KM, et al. Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 820–827.
- [74] *GIBCO*® media and culture supplements for cytogenetic analysis *Cytogenetic and Diagnostic Testing*. 2006.
- [75] Славопас ВА, Slavopas VA. BLOOD SAMPLING FROM A VEIN : BASIC RULES , METHODS , MODERN TECHNOLOGY. 2016; 44–46.
- [76] Р.Ф., Єрьоменко, Е.В., Супрун М.Б. Ш та інші. Методи лабораторної діагностики спадкових захворювань. 2017, р. 246.
- [77] Издательство ЛЭТИ. Малый практикум по цитогенетике: изучение кариотипа человека. 2018, р. 426.
- [78] Фролов А. К., Арцимович Н. Г., Сохин А. А. Иммуноцитогенетика. 1993, р. 240.
- [79] Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. К. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. 2000, р. 408.
- [80] Чеботарев А.Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека. *Вестник РАМН* 2001; 10: 64–69.
- [81] Шевченко В.А. Значимость цитогенетического обследования для оценки последствий Чернобыльской катастрофы – тема научной статьи по наукам о здоровье читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в электронной библиотеке КиберЛенинка.

- Радиоционная биология Радиоэкология* 2006; 46: 133–139.
- [82] Э.А. Демина, Е.Н. Демченко, И.Р. Барияк. Характер калибровочных кривых в цитогенетической дозиметрии. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів* 2009; 7: 184–190.
- [83] Mogavero A, Maiorana MV, Zanutto S, et al. Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Sci Rep* 2017; 7: 15992–15992.
- [84] Дёмина Э.А., Пилипчук Е.П., Михайленко В.М., et al. Анализ митотической активности лимфоцитов крови человека в условиях сочетанного облучения и ко-мутагенов. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности* 2015; 14: 48–52.
- [85] Hosseinimehr SJ. Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation. *Drug Discovery Today* 2010; 15: 907–918.
- [86] Kolivand S, Motevaseli E, Cheki M, et al. The anti-apoptotic mechanism of metformin against apoptosis induced by ionizing radiation in human peripheral blood mononuclear cells. *Klin Onkol* 2017; 30: 372–379.
- [87] Cheki M, Shirazi A, Mahmoudzadeh A, et al. The radioprotective effect of metformin against cytotoxicity and genotoxicity induced by ionizing radiation in cultured human blood lymphocytes. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016; 809: 24–32.

ДОДАТКИ

Додаток А

Параметри моделі лінійної регресії для цитогенетичних показників при рентгенівському тест-опроміненні культури лімфоцитів периферичної крові клінічно здорових осіб в діапазоні 0,1-1,0 Гр (індивідуальні показники)

Номер донора	Цитогенетичний показник на 100 метафаз	Модель лінійної регресії $Y=\alpha \cdot D+\beta$		S^2 - похибка моделі
		α	β	
1	Аберантні метафази,%	12,20	3,27	1,04
	Загальна кількість аберацій хромосом	12,20	3,27	1,04
	Дицентрики	2,97	-0,54	0,65
2	Аберантні метафази,%	17,15	5,61	1,94
	Загальна кількість аберацій хромосом	19,02	5,47	2,05
	Дицентрики	8,11	-0,12	0,18
3	Аберантні метафази,%	16,55	10,24	5,22
	Загальна кількість аберацій хромосом	20,97	10,02	5,25
	Дицентрики	6,09	-0,43	0,72
4	Аберантні метафази,%	13,99	7,78	4,18

	Загальна кількість аберацій хромосом	14,13	7,83	4,1
	Дицентрики	4,9	-0,3	0,57
5	Аберантні метафази,%	13,20	2,71	1,84
	Загальна кількість аберацій хромосом	14,19	2,53	1,72
	Дицентрики	8,62	-1,18	1,87
6	Аберантні метафази,%	11,12	-0,3	0,56
	Загальна кількість аберацій хромосом	13,80	-0,79	0,80
	Дицентрики	6,36	-0,96	1,04
7	Аберантні метафази,%	9,64	2,01	0,27
	Загальна кількість аберацій хромосом	9,64	2,01	0,27
	Дицентрики	2,85	0,68	1,28
8	Аберантні метафази,%	15,54	1,19	0,91
	Загальна кількість аберацій хромосом	18,61	0,85	0,68
	Дицентрики	6,06	-0,57	0,61
9	Аберантні метафази,%	15,52	-0,06	0,87

	Загальна кількість аберацій хромосом	16,44	-0,05	0,82
	Дицентрики	5,26	-0,66	0,53
10	Аберантні метафази,%	5,95	1,37	0,50
	Загальна кількість аберацій хромосом	5,95	1,37	0,50
	Дицентрики	2,85	0,68	0,31