

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 «**БІОХІМІЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ
МАЛИХ ДОЗ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ
В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЮ**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
Спеціальності
091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Рацун Діана Олександрівна

Керівник Руссу І.З.
кандидат біологічних наук, доцент

Керівник Дьоміна Е.А.
доктор біологічних наук, професор, зав.
відділу біологічних ефектів іонізуючого
та неіонізуючого випромінювання ІЕПОР
ім. Р.С. Кавецького НАН України

Рецензент _____

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.
« ____ » _____ 20__ р.

Київ – 2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Малі дози іонізуючого випромінювання. Детерміновані та стохастичні ефекти	7
1.2. Канцерогенні ефекти іонізуючого випромінювання	13
1.3. Радіочутливість клітин онкологічних хворих за біохімічними та цитогенетичними показниками	20
1.4. Характеристика лімфоцитів крові людини як об'єкта радіобіологічних досліджень	24
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	27
2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження	27
2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання, необхідні для дослідження	27
2.3. Підготовка розчинів, фіксатора та барвника.....	30
2.4. Методи дослідження	31
2.4.1. Визначення швидкості генерування супероксидного аніон-радикала хемолюмінесцентним методом з використанням люцигеніну	31
2.4.2. Напівмікрометод культивування лімфоцитів крові з метафазним аналізом аберацій хромосом	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	43
3.1. Вплив малих доз іонізуючого випромінювання на генерування супероксидного аніон-радикала в лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію	43
3.2. Частота і спектр аберацій хромосом у лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію за умов дії малих доз іонізуючого випромінювання	46
ВИСНОВКИ.....	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	59

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ГПХ – гостра променева хвороба

ЕПР – електронно-парамагнітний резонанс

ЗН – злоякісні новоутворення

ІВ – іонізуюче випромінювання

ІР – індивідуальна радіочутливість

ЛПК – лімфоцити периферичної крові

МДА – малоновий діальдегід

ПАС – про- та антиоксидантні системи

РЕ – рак ендометрію

РІНГ – радіаційно-індукована нестабільність геному

САР – супероксидний аніон-радикал

ХЛ – хемолюмінесценція

ЧАЕС – Чорнобильська атомна електростанція

НР – гомологічна рекомбінація

ННЕJ – негомологічне з'єднання кінців

ВСТУП

В останнє десятиліття увага дослідників зосереджена на вивченні ефектів опромінення біооб'єктів у малих (надфонових) дозах. Це пов'язано з інтенсивним упровадженням нових технологій із використанням джерел іонізуючих випромінювань (ІВ) у галузях промисловості, сільського господарства, ядерної енергетики, науки, медицини (променевої діагностики та променевої терапії) і т. ін. Відповідно зростає і чисельність персоналу, який задіяний у сфері впливу ІВ. Хронічного впливу малих доз ІВ зазнають також мешканці територій, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Вищезазначене неминуче призводить до підвищення ризику виникнення радіогенних захворювань, у тому числі раку [1].

Результати широкомасштабних довгострокових радіаційно-епідеміологічних досліджень показали, що ІВ є одним із найбільш загрозливих етіологічних факторів раку, що здатний реалізовувати свій неопластичний потенціал на всіх етапах пухлинного процесу. Так, злаякісна трансформація клітин виявляється вже при дозах, менших 0,3 сГр.

Аварії на Чорнобильській АЕС, яка сьогодні визнана глобальною радіологічною катастрофою, а також в Японії на о. Хонсю (Фукусіма-1) показали, що ядерні реактори не мають гарантій абсолютно безпечної експлуатації. Серед віддалених стохастичних ефектів Чорнобильської катастрофи найбільшу стурбованість у світового медичного і наукового співтовариства викликає підвищення частоти онкологічних захворювань.

Провідне місце у структурі онкологічної патології жіночого населення більшості країн світу займає рак ендометрію (РЕ). Згідно з даними Національного канцер-реєстру, на даний час РЕ займає третє місце серед усіх злаякісних новоутворень (ЗН) у жінок [2]. Для більшості хворих променева терапія є основним методом лікування, відповідно до міжнародного стандарту. Аналітичний огляд даних літератури, досвід іноземних та вітчизняних фахівців у галузі радіаційної онкології і клінічної

радіобіології свідчать, що незважаючи на використання новітніх технологій при розробці стратегії променевої терапії (наприклад, лінійних прискорювачів), у зону терапевтичного опромінювання неодмінно потрапляє частина нормальних клітин, у тому числі клітини циркулюючого пулу крові (наприклад, високорадіочутливі лімфоцити) із оточення пухлини. Це може обумовити розвиток тяжких променевих ускладнень (цистит, ректит), у тому числі вторинного раку [3].

Молекулярні, хромосомні, метаболічні та інші аномалії у здорових клітинах первинних онкологічних хворих змінюють функціональний стан цих клітин, у тому числі їхню радіочутливість, і тому дають підстави вважати їх лише умовно нормальними [4].

Отже, додаткові радіаційно-індуковані пошкодження в цих клітинах внаслідок терапевтичного опромінення будуть сприяти високому ризику виникнення променевих ускладнень, які потребують призначення додаткової терапії та/або переривання курсу лікування. Це в свою чергу підвищує психологічне та економічне навантаження на родину та суспільство в цілому.

З позиції безпорогової лінійної концепції, будь-яка мала доза ІВ може спричиняти шкідливий вплив на клітини та організм людини в цілому. Вважають, що хромосомні розриви є предикторами радіочутливості клітин, а хромосомні аберації – генетичної нестабільності клітин [5].

Тому актуальним є дослідження рівня та спектру аберації хромосом в імунокомпетентних високорадіочутливих клітинах – Т-лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) до і при тестуючому опроміненні в діапазоні малих доз, вплив яких можуть зазнавати немалігнізовані тканини із оточення пухлини. При цьому найкращою моделлю соматичних клітин людини для таких досліджень визнана культура ЛПК з метафазним аналізом аберацій хромосом .

Накопиченню генетичних, у тому числі хромосомних змін у клітинній популяції під впливом ІВ передують біохімічні зміни, що характеризують порушення окисного метаболізму. Пусковим механізмом цього процесу

визнано генерацію супероксидного аніон-радикала (САР). Цей потужний окисник реалізує свій потенціал при взаємодії з різними молекулами опромінених клітин, спричиняє окисну деструкцію ферментів, ДНК та запускає каскад реакцій пероксидного окиснення ліпідів у мембранах [6].

Достатньо невизначеним залишається характер залежності «доза–ефект» для біохімічних показників, зміни яких передують та сприяють формуванню генетичної нестабільності клітин онкологічних хворих.

Метою роботи було визначення особливостей індукції біохімічних та генетичних змін у лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію за умов тестуючого опромінення в діапазоні малих доз (дослідження *in vitro*).

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Вивчити характер впливу малих доз опромінення (0,1-0,5 Гр) на інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикала лімфоцитами крові хворих на рак ендометрію (група дослідження) та умовно здорових осіб (група порівняння).

2. Вивчити характер впливу малих доз опромінення (0,1-0,5 Гр) на частоту та спектр аберацій хромосом у лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію (група дослідження) та умовно здорових осіб (група порівняння).

3. На основі отриманих біохімічних та цитогенетичних показників проаналізувати та порівняти характер залежностей «доза-ефект» для хворих на рак ендометрію та умовно здорових осіб.

Об'єкт роботи: зміни у біохімічних та цитогенетичних показниках лімфоцитів периферичної крові хворих на рак ендометрію.

Предмет роботи: дозова залежність радіаційно-індукованих змін на біохімічному та хромосомному рівні Т-лімфоцитів крові хворих на РЕ.

Наукове дослідження виконано на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, у відділі біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Малі дози іонізуючого випромінювання. Детерміновані та стохастичні ефекти

Доза — це макроскопічна величина, що характеризує середню енергію, яка поглинена одиницею маси опромінюваної речовини [7]. До аварії на ЧАЕС розвивалися переважно такі радіобіологічні напрямки, у яких досліджували ефекти опромінення у великих дозах (понад 1 Гр). Результати цих досліджень дозволили з'ясувати механізми виникнення і репарації променевого ушкодження, зрозуміти клініко-гематологічний перебіг гострої променевої хвороби (ГПХ) і т. ін. [8].

Нині однією з найважливіших і в той самий час найбільш складних, до кінця не вирішених проблем радіобіології і радіаційної медицини є проблема біологічної дії малих доз ІВ. Саме визначення поняття «малі дози» наразі складає предмет дискусії. Класичне визначення «малої дози» випромінювання — це доза, при якій на один чутливий об'єм клітини припадає в середньому один трек [9]. Таким чином, це доза одиночної дії, яка залежить від якості випромінювання, довжини пробігу і траєкторії частки в досліджуваному мікрооб'ємі, його щільності, тобто вона є стохастичною величиною. Аналіз мікродозиметричних даних показав, що для мікрооб'єктів з діаметром 8 мкм (що відповідає діаметру ядер лімфоцитів людини) це доза одиночної події, яка залежить від енергії іонізуючої частки та знаходиться в інтервалі декількох мГр. Ця доза мінімальна (6 мГр) для електронів із енергіями 20–25 KeV; для протонів і альфа-частинок з енергіями 1–10 MeV вона близька до 20–100 мГр і 200 мГр відповідно; для гамма-променів ^{60}Co , ^{137}Cs , 250 кВ рентгенівського випромінювання — від одиниць до декількох десятків мГр; для нейтронів з енергією 14 MeV — десятки мГр.

Таким чином, визначення малої дози ІВ жорстко прив'язано до поняття «чутливий об'єм». Якщо за «чутливий об'єм» брати клітинне ядро, то доза, що припадає на один акт енергопоглинання при дії рідкоіонізуючого випромінювання, буде дорівнювати 0,2–0,3 сГр, якщо ж мішенню для випромінювання вважати ДНК, що складає в еукаріотичних клітинах 1–2 %, то ці дози складають 20–30 сГр. До малих доз ІВ відносять такі, що перевищують природний фон на 1 порядок (10-15 сГр і нижче), декілька сГр – 1 Гр.

Нагадаємо, що VI Грєєвську конференцію, праці якої видано у 1980 р., було присвячено теоретичним і практичним аспектам проблеми життєздатності клітин, опромінених у малих дозах, які визначалися науковими авторитетами світу як діапазон 2–2,5 Гр, тобто це дози, які найчастіше використовуються в променевої терапії онкологічних хворих. Пильна увага до малих доз ІВ визначена, насамперед, відомим основним радіобіологічним парадоксом – непропорційно високий біологічний ефект у порівнянні з поглиненою енергією [10].

У 80-ті роки минулого століття основними парадигмами радіобіології були такі: чим менша доза, тим менша шкода, хоча вона залишається, якою б малою не була доза опромінення. Більше того, основні механізми дії ІВ, встановлені при дії великих доз, справедливі в будь-якому діапазоні доз і дозволяють розрахувати імовірність шкоди при кожній, як завгодно малій величині дози. Звідси, проблема малих доз зводиться до встановлення мінімальних значень, при яких можна реєструвати ушкодження, що індуковані радіацією на організменому, тканинному, клітинному чи молекулярному рівнях. Оскільки імовірність виникнення таких ушкоджень падає зі зменшенням дози за чітко встановленими закономірностями (лінійна, лінійно-квадратична й ін.), то це не дозволяє об'єктивно визначити область малих доз. Апробованим методом оцінки поглинених доз в аварійних ситуаціях є використання цитогенетичної дозиметрії, при якій величина дози

оцінюється за рівнем аберацій хромосомного типу, а саме, променевих маркерів, у ЛПК.

Варто відмітити, що у клінічній практиці поняття малих доз варіюється в діапазоні до 1,0 Гр і описується як дози, при яких не виявляються ефекти ураження. Тобто це доза, за якої починають проявлятися нелетальні ефекти. Проте потрібно розуміти, що різні радіобіологічні ефекти в одній і тій самій клітині проявляються у відповідь на опромінення в різних дозах. І як висновок, одна і та сама доза щодо реакції найбільш радіостійкої системи клітини буде малою, а щодо реакції решти систем – великою [11]. Крім того, для дозиметрії важливу роль відіграє режим опромінення. Так, при тотальному опроміненні організму людини в дозі 1,0 Гр розвивається вже ГПХ I ступеня.

Радіобіологічні ефекти поділяються на два типи: перший – коли від значення дози залежить інтенсивність прояву ефектів; другий – коли від значення дози залежить частота прояву ефектів.

Ефекти першого типу мають назву детерміновані, вони не володіють рисами, притаманними ймовірнісному процесу. Тобто опромінення в певній дозі провокує радіаційне ураження відповідного рівня. Інтенсивність прояву цього ефекту є функцією дози. Одним із прикладів таких ефектів є ГПХ.

Якщо ж розглядати конкретно детерміновані ефекти саме малих доз ІВ, то до них можна віднести адаптивну відповідь, що є зростанням стійкості до дії підвищених доз ІВ; стимуляцію проліферативних активностей бактеріальних, рослинних та тваринних клітин у культурі та *in situ*; інтенсифікацію біохімічних та фізіологічних процесів унаслідок опромінення клітин та багатоклітинних організмів, що супроводжується загальною активацією процесів життєдіяльності організму (наприклад, посилення росту, прискорення темпів розвитку (радіаційний гормезис) та нагромадження біомаси).

Доцільно приділити увагу поняттю радіаційного гормезису, оскільки це питання є дуже актуальним. Мова йде про певний діапазон доз ІВ, у межах

якого можна спостерігати стимуляцію росту та прискорення розвитку як тваринних, так і рослинних організмів.

Найбільшу кількість досліджень на тему радіаційного гормезису було проведено на рослинах. Як виявилось, радіаційний гормезис проявляється двома максимумами в області малих доз ІВ: у порядку 10^{-2} Гр та в області одиниць Гр (наприклад, для гороху 3–10 Гр, для льону 10 Гр). Проте регулярність прояву ефекту радіаційного гормезису в різних рослинах різна – це означає, що в деяких видах та сортах ефект гормезису проявляється більш виразно, ніж в інших.

Гіпотеза, яка б пояснювала дане явище, була запропонована О.М. Кузіним. Вона роз'яснює, що гормезис зумовлюється активацією певних генів під впливом тригер–ефекторів, які у свою чергу регулюють репресію окремих ділянок геному. Можна припустити, що малі дози ІВ зумовлюють функціональне перепрограмування геному. У клітинах, які піддалися впливу малих доз ІВ, було виявлено зміщення прицентромерних ділянок хромосом до центру ядра, що, можливо, і спричинило згадане вище перепрограмування геному.

Що ж стосується радіаційного гормезису в організмі тварин – то прискорення оновлення тимоцитів, зростання реактивності макрофагів селезінки до конканаваліну А та секреції ними інтерлейкіну-2 виявляється при опроміненні дозами, які не перевищують 10 сГр (10^{-2} Гр).

Підсумовуючи дане питання, варто наголосити: явище радіаційного гормезису не свідчить те, що малі дози є безпечними для біологічних систем. Так, інколи він є проявом соматичних реакцій, проте одночасно з цим виникають стохастичні ефекти – молекулярні ушкодження, виникнення генетичних порушень та трансформація клітин (дані ефекти описані нижче).

Другий тип радіобіологічних ефектів, коли від значення дози залежить частота прояву реакцій, називають стохастичним (ймовірнісним). Прояв реакцій біологічних систем на дію ІВ характеризується ймовірнісною величиною. Це означає що цей ефект може проявитись із часом, а може і ні.

У даному випадку інтенсивність прояву стохастичних ефектів зовсім не залежить від дози – від дози залежить частота їх проявів. Прикладом таких ефектів виступає клітинна мутація, яка супроводжується канцерогенезом.

Відкладення енергії ІВ в ділянках генів є ймовірнісним процесом, в результаті якого формуються точкові мутації того чи іншого гена. У випадку таких трансформацій протоонкогени можуть переходити в стан онкогенів. Проте така варіація подій можлива тільки в тому випадку, коли відбулося влучання фотона або ж частинки ІВ у певні ділянки хромосоми. І як правило, таке влучання є ймовірнісним процесом. Тому мутації і відносяться до стохастичних ефектів [12]. А оскільки з мутації клітини розпочинається пухлинне переродження тканини, то з цього випливає, що формування ЗН, індукованих опроміненням, теж являється стохастичним ефектом, як і появи хромосомних аберацій.

Відомо, що частоту стохастичних ефектів можливо змінювати, впливаючи на ефективність процесів репарації ДНК або на інтенсивність клітинної селекції. Наприклад, повністю логічним є збільшення кількості точкових мутацій на одиницю дози в разі блокування репарації ДНК. Таку функцію – елімінацію трансформованих клітин (у вищих тварин) – здійснює імунна система.

Стохастичні ефекти часто характеризуються пізнім проявом. Це пояснюється тим, що радіаційно-індуковані ушкодження ДНК іноді реалізуються у віддалених нащадків опромінених клітин у кількох їх поколіннях. Таким чином, носіями потенційних ушкоджень можуть бути окремі клітинні лінії.

Як зазначено вище, стохастичні ефекти ґрунтуються на ймовірнісній природі влучань іонізуючих частинок або фотонів у певні клітинні структури. Найпроблематичнішим якраз і є цей ймовірнісний характер етапів розвитку уражень (рис. 1.1), який важко спрогнозувати.

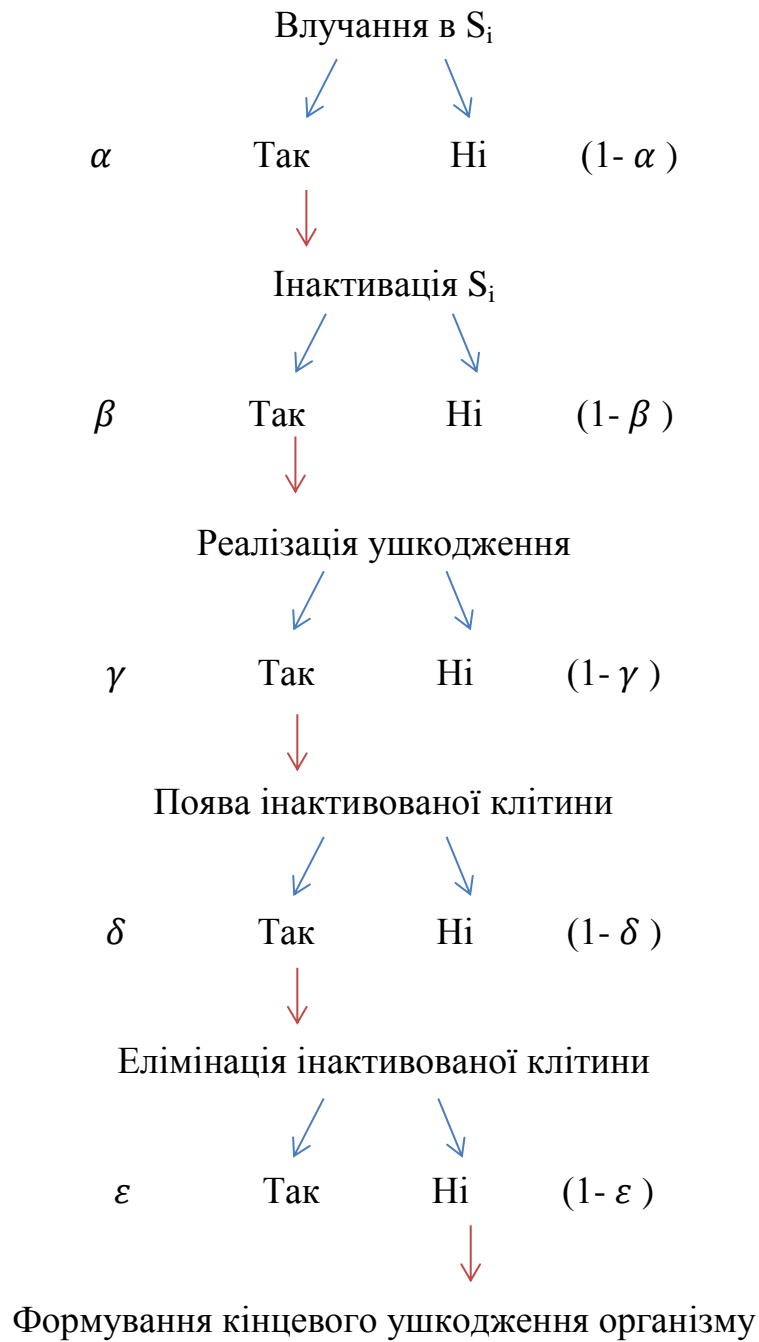


Рис. 1.1. Схема ймовірності здійснення окремих етапів променевого ураження організму [13].

З даної схеми очевидно, що ймовірність прояву ефекту (W) визначається, як добуток зазначених на схемі ймовірностей здійснення окремих етапів формування даного ефекту:

$$W = \alpha \times \beta \times \gamma \times \delta \times (1 - \varepsilon) \quad (1.1)$$

Основним законом стохастичних ефектів є те, що в них реалізуються явища, які в свою чергу або проявляються повністю, або не проявляються взагалі. Тобто мутація або виникає, або ні, за принципом «все або нічого».

Загалом стохастичні та детерміновані ефекти в багатьох системах тісно переплітаються між собою, оскільки первинні процеси променевого ураження є природно ймовірнісними.

Також доцільним буде наголошення на тому факті, що якщо прояв стохастичного ефекту є наслідком влучання фотону або частинки ІВ у відповідну мішень і зовсім не відображає кількість поглинутої мішенню енергії, то за мінімальних значень дози ефект проявляється повною мірою.

1.2. Канцерогенні ефекти іонізуючого випромінювання

«Рак – генетично детерміноване захворювання, яке виникає внаслідок порушення нормальної регуляції росту клітин під впливом різноманітних мутацій» [14]. «Рак – захворювання експресії генів, при якому порушується нормальна робота складних мереж, керуючих гомеостазом, що дозволяє клітинам рости автономно від потреби організму в цілому» [15]. Більшість пухлин індукуються виключно мутаціями в соматичних клітинах, однак деякі їх види можуть бути спричинені спадковими мутаціями, які передаються статевими клітинами від покоління до покоління. Спадкові пухлини, що детермінуються одним геном, складають всього 5,0-7,0 %, у той час як основна частина – це мультифакторні пухлини, що розвиваються під впливом генетичних факторів та факторів довкілля, в тому числі радіаційного [16].

Канцерогенез складається з етапів ініціації, промоції та прогресії, кожен із яких включає кілька стадій і здійснюється за участю спадкових (онкогени, тумор-супресорні гени) і середовищних факторів (Табл. 1.1) [17].

Таблиця 1.1

Етапи канцерогенезу [18]

Етап	Характеристика етапу
Ініціація	<p>Метаболічна активація ксенобіотиків із утворенням кінцевих високоактивних канцерогенів. Під впливом активації онкогену клітина набуває незворотних змін. Проте ця клітина морфологічно не відрізняється від нормальної. Фенотипові зміни можливо виявити тільки після утворення клітинного клону. До таких змін відносять прискорений ріст, порушення форми ядра, продукція адренкортикотропного гормону клітинами мілкоклітинного раку бронхів.</p> <p>Агенти-ініціатори діють безпосередньо на ДНК (радіація). АФК атакують азотні основи і дезоксирибозу ДНК через токсичні альдегіди.</p>
Промоція	<p>Прискорення проліферації пухлинного клону з новоутворенням під впливом окислювального стресу доброякісної пухлини, який є оборотним на першій стадії та необоротним на другій.</p>
Прогресія	<p>Безпосередньо перетворення доброякісної пухлини у злоякісну із значним пришвидшенням росту, інвазивністю, підвищенням генетичної нестабільності, виникненням метастазів. Генетична нестабільність у свою чергу асоційована з раковим прогресом, мутацією онкогенів та тумор-супресорних генів (наприклад, p53). Виникає мережа взаємодіючих онкогенів і супресорів, яка визначає можливі шляхи канцерогенезу.</p>

ІВ є одним із найбільш сильних імунодепресантів та повним канцерогеном, який здатний реалізувати свій непластичний потенціал на всіх етапах пухлинного процесу [19].

Злоякісна трансформація клітини може проявитися при дозі ІВ 0,3 сГр [20]. Це означає, що ІВ може ініціювати і викликати появу нових пухлин або

прискорювати процеси вже існуючої зляканої трансформації клітин, розвиток яких не був спочатку радіаційно-ініційованим [21].

Розрізняють два основних класи генів, які відповідають за ініціацію канцерогенезу: онкогени та гени-супресори. Перші, онкогени, викликають злякане переродження клітин при збільшенні експресії мутацій, а другі – гени-супресори – при зниженні або повному її виключенні. При перетворенні протоонкогенов у онкогени з'являється нова генетична інформація, а інактивація генів-супресорів – це результат втрати генетичної інформації. Радіаційно-індукована інактивація генів-супресорів відбувається значною мірою за рахунок делецій, а активація протоонкогенів – за рахунок точкових мутацій або хромосомних перебудов [22,23]. Вважають, що хромосомні аберації, які формуються внаслідок двониткових розривів ДНК, відіграють важливішу роль у розвитку радіаційного канцерогенезу, ніж точкові мутації [24,25]. При радіаційному канцерогенезі встановлена можливість трансдукції: радіаційно-індуковані фрагменти ДНК вивільняються з пошкодженої клітини після її загибелі і вбудовуються в геном сусідньої нормальної клітини, трансформуючи її [26]. Хромосомна нестабільність є однією із найбільш показових характеристик пухлинних клітин.

Протягом великого періоду головною була парадигма, згідно з якою ІВ обумовлює онкогенну трансформацію клітин через генетичний механізм формування радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК. Було отримано численні дані стосовно механізмів формування радіаційного канцерогенезу, які дозволяють проводити пошук маркерів підвищеного ризику розвитку пухлин радіаційного генезу. Особливу увагу приділяють онкоспецифічним ДНК-маркерам, частина яких формується на ранніх, доклінічних стадіях канцерогенезу [27]. Відповідно до сучасних уявлень, у процесі радіаційного канцерогенезу беруть участь також епігенетичні механізми, спрямовані саме на зміну функції генів, а не їх структури [28].

Прикладом зв'язку між епігенетичними порушеннями та геномною нестабільністю в процесі канцерогенезу є епігенетично інгібовані транскрипції генів, які відповідають за репарацію ДНК [29].

Особливої уваги заслуговує таке досягнення молекулярної біології, відкриття тумор-супресорного гену p53 та його білкового продукту P53. Даний ген та його білковий продукт беруть участь у 5 найважливіших біологічних процесах, таких як контроль клітинного циклу, репарація ДНК, апоптоз, мутагенез, канцерогенез. Білок P53 забезпечує контроль стану ДНК протягом всіх стадій клітинного циклу. Якщо ж він виявляє пошкодження структури ДНК, то активує реакції, які приводять до зупинки клітинного циклу в чек-пойнтах, з ціллю створення додаткового часу для репарації пошкодженої ділянки ДНК [30,31]. Якщо ж репарація була неефективною, то білок P53 запускає механізми апоптозу, які в свою чергу призводять до елімінації дефектної клітини. Ген p53 є рецесивним. Причиною порушення його структури є точкові мутації, які в подальшому призводять до синтезу нефункціонального білка P53. Тому його інактивація при мутаціях та делеціях з втратою алеля має одну із центральних позицій у розвитку пухлин [32]. Мутації в гені p53 не змінюють продукцію білка P53, але створюють умови для виникнення мутантних клітинних клонів, що підвищує ймовірність їх подальшої злоякісної трансформації.

Результати роботи [33] показують, що в людей, які зазнали дії ІВ, ймовірність виникнення мутацій *de novo* у «гарячих точках» гена p53 та протоонкогена N-Ras значно збільшується. Автори роботи запропонували наступний шлях формування радіогенних пухлин: у частини клітин, що вижили після опромінення, виникає функціонально змінене потомство з радіаційно-індукованою нестабільністю геному (РІНГ), у яких за рахунок гіперпродукції активних форм кисню (АФК) із високою частотою протягом багатьох поколінь виникають *de novo* пошкодження геному. Ці відстрочені прояви радіаційного ефекту не мають клонального характеру і передаються епігенетично, а отже, можуть бути модифіковані. Для таких клітин

характерне зниження ефективності репараційних процесів і наявність оксидативного стресу [34,35]. Оксидативний стрес призводить до пошкоджень ДНК в області «гарячих точок» генів p53 і N-Ras. У клітинах, в яких виникли мутації, знижується ефективність p53-залежного контролю над підтриманням стабільності геному, а мутації в гені N-Ras призводять до активування сприятливих для проліферації клітинних сигнальних шляхів, ініційованих Ras-білками. Ці мутації не передаються генетично, але можуть виникати з високою ймовірністю *de novo* [36].

Головним критерієм розвитку віддалених стохастичних наслідків опромінення вважається ймовірність виникнення у клітини, що вижила, нерепарованих ушкоджень геному. Шляхом апоптозу в багатоклітинному організмі елімінуються генетично дефектні клітини [37]. Процеси репарації мають ключову роль у запобіганні розвитку ефектів малих доз ІВ.

До радіаційно-індукованих пошкоджень відносять одниткові та двониткові розриви, модифікації основ (пошкодження або втрати), зшивки ДНК-ДНК та ДНК-білок [38].

До речі, виникнення двониткових розривів спостерігається набагато рідше, ніж виникнення інших пошкоджень. Двониткові розриви є наслідком одночасного розриву двох ниток ДНК в одному місці; їх виникнення пропорційне дозі радіації. Так, виникнення більше 90 % таких розривів характерне при опроміненні в малих дозах ІВ [39].

Двониткові розриви ДНК є найбільш критичним пошкодженням для клітини, оскільки вони зумовлюють перебудову геному, репродуктивну загибель клітин і є найбільш ранньою серед канцерогенних подій [40]. У репарації пошкоджень даного типу беруть участь два механізми: гомологічна рекомбінація (HR) та з'єднання негомологічних кінців (NHEJ) [41]. Механізм HR безпомилковий, у ньому беруть участь декілька генів – RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3. Тому логічно, що відсутність даних генів або ж їх мутація блокує механізм HR. Також в репарації беруть участь

ще дві родини генів – це BRCA1 та BRCA2, порушення функції яких викликає дефекти репарації ДНК в клітинах.

Що ж стосується механізму NHEJ, то він виступає як швидший механізм репарації, проте не такий точний, як HR. Дуже часто у відпрепарованих сайтах можна виявити делеції основ.

Також існує гіпотеза, що репарація критичних ушкоджень ДНК, індукованих діпазонами малих доз, є взагалі низькоефективною. Це зумовлено відсутністю індукції арешту G₂/M–чекпойнту і обмеженням доступу компонентів системи репарації двониткових розривів та перехресних міжниткових зшивок в ушкоджені ділянки ДНК [42].

При тестуючому опроміненні ЛПК людини в дозі 3,0 Гр радіаційно-індукована хромосомна нестабільність близька до геномної нестабільності пухлинних клітин [43].

Головні відмінності пухлинних клітин від нормальних – це відсутність нормального контролю росту; зменшення фібронектину клітинної поверхні; ушкодження поверхневих компонентів клітини (білків, глікопротеїнів, сіалових кислот); порушення глікозилування; збільшення чутливості до аглютинуючих лектинів; зниження кількості мітохондрій; порушення клітинної комунікації; ушкодження цитоскелету; зміни клітинно-поверхневих проекцій; порушення клітинної рухливості (хемотаксису); зміни вмісту і секреції ензимів; збільшення гістологічної гетерогенності цитоплазми, ядерний плейоморфізм; наявність активованих продуктів онкогенезу; підвищення частоти аберацій хромосом.

Для РІНГ притаманний один механізм, завдяки якому в неопромінені клітинах, які знаходяться у безпосередній близькості до опромінені, можуть виникати порушення, схожі до радіаційно-індукованих [44,45]. Даний феномен носить назву «ефект свідка», «ефект прохожого», «комунальний ефект», а також «байстендер-ефект». Даний ефект може обумовити клітинну загибель, арешт клітинного циклу, апоптоз, зміну експресії генів, розвиток РІНГ у неопромінені клітинах [46,47].

Природній радіаційний фон постійно впливає на організм людини, через це його рівень прийнято рахувати прийнятним опроміненням. Проте фонове опромінення може бути потенційно канцерогенним фактором. З метою підтримання генетичного гомеостазу в поколіннях організмів еволюційно склалась антимутагенна система, функцією якої є репарація генетичних пошкоджень. Вона складається з трьох рівнів: перший – ферменти, які захищають спадкові структури (супероксиддисмутаза, каталаза); другий – система репарації ДНК; третій – системи, які забезпечують стабільність на рівні організму.

Висока радіочутливість імунної системи (основною функцією якої є забезпечення генетичної сталості внутрішнього середовища організму) та радіаційно-індуковані хромосомні аберації в імунокомпонентних клітинах можуть бути однією з причин порушення функції імунного нагляду та розвитку пухлин [48,49].

РІНГ безпосередньо пов'язана із опроміненням у першу чергу здорових органів та тканин у процесі радіотерапії первинного раку. Приблизно 10 % випадків завжди є причиною розвитку радіаційного канцерогенезу – виникнення вторинної пухлини [50,51]. Протягом перших 10 років після променевої терапії розвиваються лейкози, а в більш віддалений період часу – солідні пухлини. Існує три різних механізми розвитку радіаційного канцерогенезу (який виник після променевої терапії), які залежать від просторово-часового розповсюдження дози і, звісно, віку хворого [52]. Автори рекомендують при проведенні променевої терапії мінімізувати ризик розвитку радіаційного канцерогенезу шляхом зниження дозового навантаження на здорові тканини із оточення пухлини до дози 0,05 Гр [53].

1.3. Радіочутливість клітин онкологічних хворих за біохімічними та цитогенетичними показниками

Стандартне визначення поняття радіочутливості звучить так: «це здатність живих організмів реагувати у відповідь на подразнення, викликане поглинутою енергією ІВ» [54].

Існує перелік відомих на сьогодні генів людини, для яких був доведений прямий зв'язок із формуванням радіочутливого фенотипу клітини. До таких генів належать гени репарації РНГ, гени контролю клітинного циклу та гени індукції механізмів радіозахисту та детоксикації ксенобіотиків. Існує припущення, що поліморфізм саме цих генів лежить в основі індивідуальних відмінностей в активності специфічних ферментів, які і забезпечують здатність клітин до відновлення, та розмаїття їхніх реакцій на дію радіаційного фактора [55]. Спадкова (генетично зумовлена) підвищена ІР, низька репаративна здатність, зміни в регулюванні клітинного циклу є причинами підвищеного ризику розвитку ЗН приблизно в десять разів [56]. Доцільним буде уточнити, що люди із синдромами спадкової хромосомної нестабільності мають високу чутливість соматичних клітин до дії ІВ [57,58].

Таким чином, на основі даних літератури можна узагальнити, що ІР тісно пов'язана із процесами репарації. Було проведено вдосталь досліджень, які показували, як із відомих результатів про репаративні функції отримати інформацію про ІР людини. Якщо коротко охарактеризувати сам принцип кореляції, то він буде звучати так: кількість хроматидних делецій у метафазних клітинах, які були оброблені після опромінення в G_2 -стадії колцемідом, відобразить кількість нерепарованих подвійних розривів молекули ДНК та здатність клітин репарувати радіаційно-індуковані пошкодження молекули ДНК. Як показують результати, чим більше спостерігається нерепаративних пошкоджених ділянок, тим більша ІР людини. Такий показник, як частота хроматидних аберацій, хроматидних розривів, індукованих в G_2 -стадії клітин, можна використовувати для

формування груп підвищеного ризику відносно розвитку радіогенного канцерогенезу [59], що є особливо актуальним у терапії онкологічно хворих пацієнтів. Це зумовлено тим, що у таких хворих спостерігаються ускладнення, а саме, радіаційно-індуковані реакції здорових тканин, що в 10-15 % проявляються у вигляді вторинних радіаційно-індукованих пухлин [60,61]. Через відсутність інформації з приводу ІР пацієнта використання стандартної дози ІВ при радіотерапії – це звичайне рішення. Слід брати до уваги той факт, що для людей із високою ІР такі стандартні дози можуть викликати тяжкі ускладнення із боку здорових тканин.

У роботах [62,63] обґрунтовано, що дестабілізація хромосомного апарату ЛПК опромінених осіб є показником схильності до розвитку ЗН, а подальший аналіз аберацій хромосом виступає як об'єктивний метод оцінки даного стану. Підхід до визначення ІР полягає в оцінці цитогенетичних ефектів, індукованих тестуючим опроміненням у постсинтетичному періоді мітотичного циклу стимульованих ЛПК людини (radiation sensitivity G_2 -assay). Результати проведених досліджень, у яких проводився даний тест, демонстрували підвищену чутливість клітин хворих онкологічного профілю до опромінення, порівняно з умовно здоровими людьми.

G_2 -тест (G_2 -assay) є ефективним підходом для оцінки і прогнозування ІР людини, враховуючи наступне: інформація про аберації хромосом у соматичних клітинах відображає дозове навантаження та процеси репарації, індуковані безпосередньо проведеним опроміненням. Також дана інформація виступає як кінцевий результат променевого ушкодження, завдяки якому можна робити висновки з приводу формування індивідуальної клітинної відповіді на ІВ; аберації виступають у ролі індикатора дії ІВ; підвищений рівень аберацій хромосом у ЛПК людини є біологічним маркером підвищеного ризику виникнення ЗН [64,65]. Також РІНГ збільшує ризик розвитку ЗН, а цитогенетичний аналіз виступає об'єктивним методом оцінки вірогідності даного процесу. Таким чином, цитогенетичні показники

служать інформативним та специфічним маркером гіперчутливості до дії ІВ та канцерогенного ризику.

У проведеному дослідженні [66] була поставлена мета вивчення біохімічних предикторів радіочутливості клітин людини. Одним із таких біохімічних показників виявилась інтенсивність генерування САР, який в свою чергу є пусковим фактором запуску вільнорадикальних процесів у стресових ситуаціях.

Цитогенетичні дослідження на дану тематику є особливо актуальними, коли мова йде про онкологічних хворих. Так, були отримані результати про збільшення частоти хромосомних аберацій у ЛПК, яка суттєво була пов'язана із ризиком розвитку раку сечового міхура. Доведено, що загальні і хромосомні аберації в ЛПК можуть бути унікальним набором біомаркерів для оцінки ризику уротеліальної карциноми та плоскоклітинного раку [67].

У сфері генетичних досліджень досягнуто значних успіхів в оцінці ролі генетичних варіацій у генах репарації ДНК щодо клінічної радіочутливості при раку. Міссенс-мутації в гені АТМ, пов'язані з фенотипом при захворюванні атаксія-телеангіектазія, і усічені мутації у гені NBS1, пов'язані з синдромом Неймегена, ймовірно, роблять свій внесок у підвищений ризик радіаційно-індукованого раку в загальній популяції. Було висловлено припущення, що кілька поліморфізмів у генах RAD51 і XRCC3 пов'язані з радіочутливістю при раку.

Створення і використання профілів генетичного ризику може забезпечити значне підвищення ефективності популяційних програм втручання при онкології. Це також повинно допомогти у прогнозуванні радіочутливості, що в кінцевому підсумку дозволить індивідуально адаптувати лікування і знизити ризик розвитку гострих реакцій при протипухлинній променевої терапії [68]. Також було визначено, що стан репараційних процесів у ЛПК хворих на РЕ асоціюється з експресією білків репарації неспарених пар основ MSH2 та MLH1 в аденокарциномах

ендометрію, що в свою чергу дозволило припустити потенційну можливість використання особливостей ЛПК як сурогатних маркерів [69].

У роботі [70] були визначені такі показники, як вміст малонового діальдегіду (МДА) та вільних SH-груп, активність каталази та співвідношення про- і антиоксидантних систем (ПАС) методом хемолюмінесценції (ХЛ), трансмембранний потенціал мітохондрій, мітотичний індекс мітоген-стимульованих клітин, кількість та спектр аберацій хромосом, відсоток апоптотичних клітин.

Було виконано комплексне дослідження периферичної крові первинних хворих на РЕ із залученням вищезазначених показників, що відображають променеву відповідь клітин із оточення пухлини. Згідно з результатами роботи, у крові хворих була підвищена концентрація МДА, що свідчило про активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів. У пацієнтів спостерігалось достовірне зниження активності процесів апоптозу ЛПК, що може бути пов'язане із зсувом ПАС у бік антиоксидантних процесів. Середньогрупові значення мітотичного індексу стимульованих ЛПК хворих незначно відрізнялись від контрольного рівня, але тестуюче опромінення гальмувало мітотичну активність цих клітин із зниженням у діапазоні доз 0,5–3,0 Гр майже до 3 разів. В опромінених клітинах майже у 2 рази зростав рівень індукованих аберацій хромосом, а частота променевих маркерів (дицентричних хромосом) – у 15 разів.

Схожі результати були отримані при визначення кореляційних зв'язків між станом ПАС у крові хворих на рак передміхурової залози та хромосомною нестабільністю ЛПК [71]. Зафіксовано формування оксидативного стресу внаслідок підвищення утворення вільнорадикальних сполук на фоні виснаження пулу вільних SH-груп і зниження активності ферменту каталази. Це спостерігалось на тлі підвищеного рівня аберацій хромосом у ЛПК й може свідчити, що зазначені процеси є однією зі складових формування генетичної нестабільності соматичних клітин у хворих онкологічного профілю.

Кореляція між високим рівнем ІР хворих та зменшенням продукції вільнорадикальних сполук у ЛПК внаслідок тестуючого опромінення може бути зумовлена різним ступенем радіаційного ушкодження даних клітин [72].

1.4. Характеристика лімфоцитів крові людини як об'єкта радіобіологічних досліджень

Лімфоцит є основною функціональною клітиною не тільки імунної системи, але й кровотворення. Дозрівання лімфоцитів відбувається безперервно, тому їх популяція складається із клітин, які знаходяться на різних стадіях диференціювання [73]. Проте в циркулюючому пулі периферичної крові вони знаходяться на стадії G_0 , тобто спокою, тому представляють синхронізовану популяцію клітин.

Особливістю ЛПК (рис. 1.2) є те, що вони здатні розпізнавати не тільки чужорідні антигени, а й свої продукти, які піддалися змінам. Таким чином Т-лімфоцити забезпечують імунну протипухлинну активність організму. І це тільки одна передумова, через яку вони виступають унікальним об'єктом для радіобіологічних досліджень. Важливу роль відіграє простота та доступність отримання вихідного матеріалу, а також висока концентрація цих клітин, яка дорівнює $1-3 \times 10^6$ лімфоцитів у 1 мл крові.

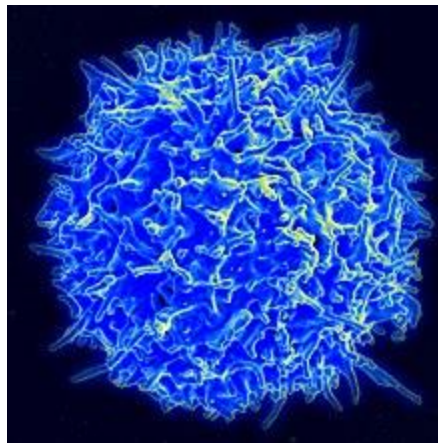


Рис. 1.2. Зображення Т-лімфоцита людини, отримане за допомогою скануючої електронної мікроскопії [74].

Також даний тип клітин має високу радіочутливість хромосом у порівнянні з хромосомами інших клітин, що коректно дозволяє реєструвати достовірні результати підвищення індукованого рівня аберацій хромосом над спонтанним. Спонтанний рівень аберацій хромосом у ЛПК є доволі низьким. Він варіює через забруднення навколишнього середовища мутагенними факторами, через появу шкідливих звичок, а також залежно від віку [75]. Встановлено, що кількість аберантних ЛПК в умовно здорових людей коливається від 0 до 5 % (в молодому віці 1 %, у віці 70 років 4 %). Збільшення відсотка аберантних лімфоцитів у міру старіння організму пояснюється тим, що процеси репарації стають менш ефективними.

Через можливість варіювання спонтанного рівня хромосомних аберацій потрібно при проведенні досліджень, які стосуються впливу будь-яких факторів на частоту аберацій, проводити їх також у контрольній вибірці, причому терміни проведення даного дослідження повинні бути однаковими як в контрольній, так і в основній групі [76].

Використання тест-системи культури ЛПК дозволяє не вдаватися до вимушеної екстраполяції ефектів, отриманих на інших модельних об'єктах, оскільки ми можемо проводити дослідження безпосередньо на клітинах людини [77]. Також виявляється кількісна залежність від дози опромінення утворення аберацій хромосом у ЛПК, і крім того, що доволі важливо, майже ідентичний вихід можна отримати при опроміненні клітин *in vitro* та *in vivo* [78]. Ще однією передумовою використання саме цих клітин у радіобіологічних дослідженнях є те, що вони можуть виступати об'єктами G₂-тесту.

Висока мобільність лімфоцитів у кров'яному руслі, розподіл лімфатичних вузлів по всьому організмі та властивість лімфоцитів акумулювати аберації хромосом відіграють важливу роль у дослідженні ІР людини.

Мітотичний цикл – це комплекс взаємопов'язаних послідовних біохімічних процесів у клітині, який перш за все включає синтез ДНК, РНК,

білків і завершується мітозом. В організмі лімфоцити знаходяться на стадії G_0 , виконуючи тільки свої специфічні функції [79]. Перехід Т- лімфоцитів з стану спокою у бластні форми має назву бласттрансформація. У цей період у лімфоцитах індукуються біохімічні процеси, які призводять до інтенсифікації синтезу білка, РНК, ДНК, що в свою чергу забезпечує мітотичний поділ клітин. Властивість бласттрансформації є найбільш універсальним показником функціональної активності імунокомпетентних клітин – лімфоцитів. Вивчення хромосомного мутагенезу на основі опромінення ЛПК в умовах *in vitro* об'єктивізує оцінку радіочутливості ЛПК людини в різних стадіях мітотичного циклу.

Накопиченню генетичних, у т. ч. хромосомних змін у клітинній популяції під впливом ІВ передують біохімічні зміни, що характеризують порушення окисного метаболізму. Пусковим механізмом цього процесу визнано генерацію САР. Цей потужний окисник реалізує свій потенціал при взаємодії з різними молекулами опромінених клітин, спричиняє окисну деструкцію ферментів, ДНК та запускає каскад реакцій пероксидного окиснення ліпідів у мембранах [80].

Злоякісна трансформація клітини може проявитися при дозі ІВ 0,3 сГр. Це означає, що ІВ може ініціювати і викликати появу нових пухлин або прискорювати процеси вже існуючої злоякісної трансформації клітин, розвиток яких не був спочатку радіаційно-ініційованим.

Актуальним є дослідження рівня та спектру аберації хромосом в імунокомпетентних високорадіочутливих клітинах – ЛПК до і при тестуючому опроміненні в діапазоні малих доз, вплив яких можуть зазнавати немалігнізовані тканини із оточення пухлини. При цьому найкращою моделлю соматичних клітин людини для таких досліджень визнана культура ЛПК із метафазним аналізом аберацій хромосом [81].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження виступають зміни у біохімічних та цитогенетичних показниках ЛПК хворих на РЕ. Предметом дослідження є дозова залежність радіаційно-індукованих змін на біохімічному та хромосомному рівні ЛПК хворих на РЕ.

Після забору крові епендорфи з її зразками (0,8-0,9 мл) опромінювали в Національному інституті раку МОЗ України на експериментальній рентгенівській установці «РУМ-17». Дози опромінення становили 0,1 Гр; 0,3 Гр; 0,5 Гр. Далі проводилося біохімічне дослідження швидкості генерування САР методом ХЛ із використанням люцигеніну, для якого проводили спочатку виділення ЛПК, потім їх підрахунок та розведення до необхідної концентрації. Після отримання результатів з приладу Auto Lumat LB953 та в програмі «Hercules» було проведено їх аналіз. Другим етапом роботи було проведення модифікованого напівмікрометоду культивування культури ЛПК з подальшим метафазним аналізом радіаційно-індукованих аберацій хромосом (рис.2.1).

2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання, необхідні для дослідження

При проведенні досліджень використовували такі витратні матеріали:

- дезінфікуючий розчин;
- спиртові серветки;
- марлеві серветки;

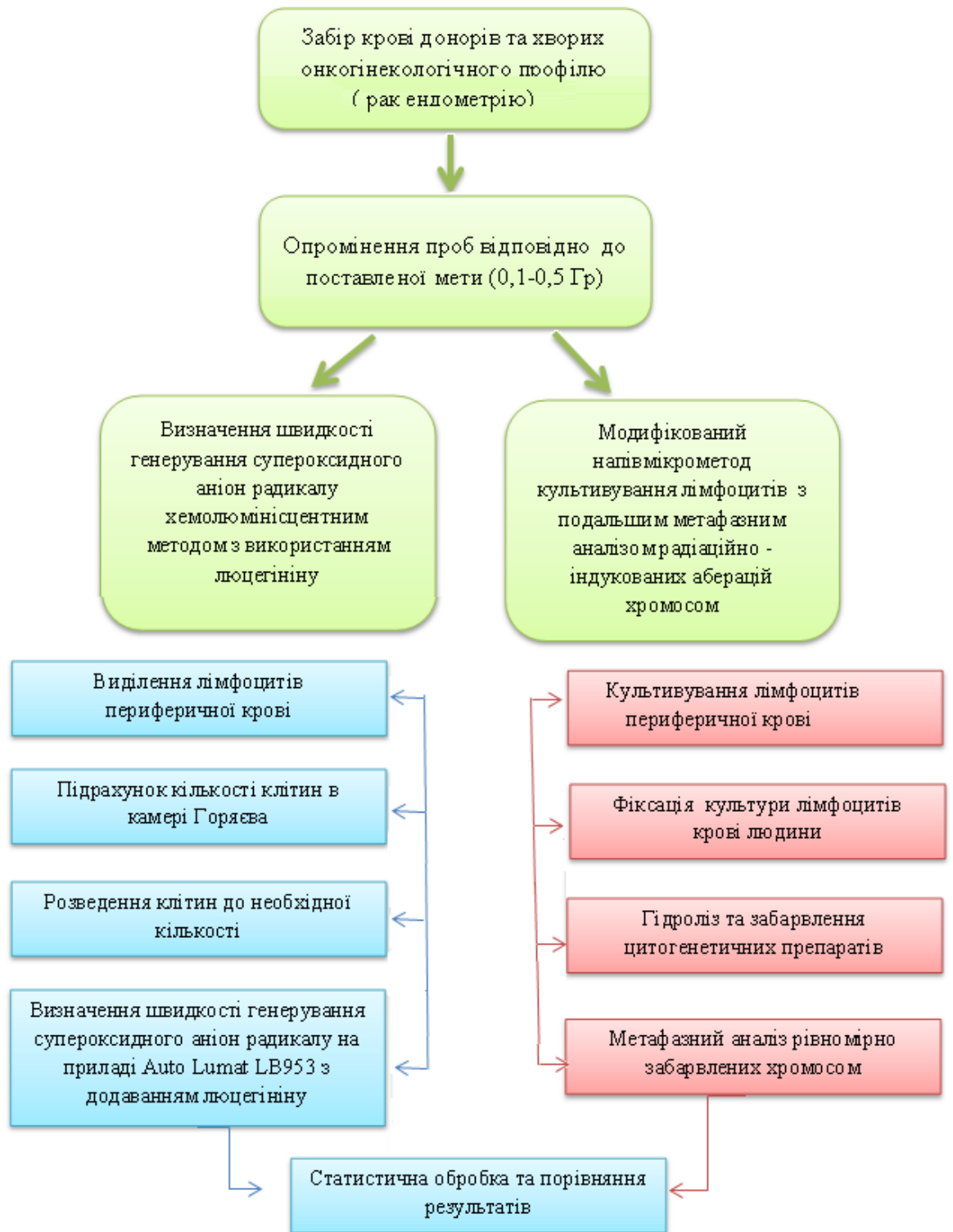


Рис. 2.1. Схема експерименту.

- паперові серветки;
- предметні скельця;
- шприци стерильні об'ємом 4, 6, 10, 20 мл;
- нестерильні пастерівські піпетки;
- пробірки;
- нестерильні рукавички;
- стерильні рукавички;
- бідистильовану воду;
- мийний засіб для обробки предметних скелець;
- білі, жовті, сині накінечники для автоматичної піпетки.

Реактиви:

- Гістопак-1077 HYBRY-MAX;
- фізіологічний розчин;
- трипановий синій;
- розчин 0,55 М KCl;
- фіксатор культури клітин (етиловий спирт із крижаною оцтовою кислотою);
- 5 Н соляна кислота;
- барвник Романовського-Гімза ;
- живильне середовище RPMI-1640;
- фітогемаглютинін (PHA-M) ;
- колцемід;
- розчин гіпотонії (0,55 М KCl).

Обладнання:

- ламінарний бокс;
- експериментальна рентгенівська установка «РУМ-17»;
- інкубатор (5 % CO₂);
- термостат;

- ваги електронні;
- термостат водяний;
- витяжна шафа;
- морозильна камера;
- холодильник;
- вортекс;
- центрифуга;
- спиртовий пальник;
- піпетка автоматична;
- світловий мікроскоп;
- дозатор.

Лабораторний посуд:

- центрифужні пробірки ;
- штативи для пробірок;
- стерильні пінцети;
- стерильні скальпелі;
- скляні мірні стакани;
- мірні циліндри;
- стерильні пастерівські піпетки;
- склянки для розчинів;
- скляний флакон з кришкою;
- 96-лунковий планшет.

2.3. Підготовка розчинів, фіксатора та барвника

2.3.1. Приготування розчину для проведення гіпотонії. Для того, щоб отримати розчин 0,55 М КСІ, зважували 550 мг КСІ на електронних вагах. Розчиняли зважений КСІ у 100 мл в дистильованій воді (важливо, щоб тара, в

якій проводилося дослідження, була чиста та герметично закрита). Далі отриману суміш поміщали у термостат та підігрівали до 37°C.

2.3.2. Приготування фіксатора культури клітин. Змішували етиловий спирт та крижану оцтову кислоту, у співвідношенні 3:1. Далі поміщали його до холодильної камери (-18°C) та залишали там аж до моменту фіксації. Приготування фіксатора відбувалося під витяжною шафою.

2.3.3. Приготування 5 Н соляної кислоти. Для того, щоб отримати розчин 5 Н соляної кислоти, до 550 мл дистильованої води додавали 450 мл концентрованої соляної кислоти та перемішували. Далі залишали розчин у закритому посуді.

2.3.4. Приготування барвника Романовського-Гімза. Для того, щоб отримати 2 % розчин барвника Романовського-Гімза, розчиняли у 8 мл дистильованої води 2 мл барвника Романовського-Гімза. Важливо, що приготовлений барвник може використовуватись лише протягом одного робочого дня.

2.4. Методи дослідження

2.4.1. Визначення швидкості генерування супероксидного аніон-радикала хемолюмінесцентним методом із використанням люцигеніну. Головним джерелом усіх радикалів у нормально функціонуючих клітинах тварин і людини служить реакція одноелектронного відновлення молекулярного кисню, що призводить до утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$. Цей радикал утворюється або НАДФН-оксидазним комплексом цитоплазматичної мембрани, або мембранами ЕПР, або дихальним ланцюгом внутрішньої мембрани мітохондрій. Другий радикал, який має не менше значення в житті клітини – це монооксид азоту NO , що утворюється NO -синтазами. Обидва радикали утворюються ферментними системами і були названі первинними радикалами.

Всі радикали дуже реактивні, і первинні радикали швидко переходять у молекулярні продукти. Спеціальний фермент супероксиддисмутаза (СОД) перетворює САР у пероксид водню HOOH . NO у присутності САР реагує з ним із утворенням токсичного іона пероксинітриту ONOO . Супероксид має здатність відновлювати тривалентне залізо, збережене в феритині, або те, що входить до складу залізно-сірчаних комплексів ланцюгів перенесення електронів, до двовалентного, що і відбувається в несприятливих для клітини умовах. Двовалентне залізо охоче реагує з HOOH або гіпохлоритом з утворенням надзвичайно активного радикала гідроксилу $\cdot\text{OH}$, а також здатне розгалужувати ланцюги окислення ліпідів, реагуючи з ліпогідропероксидами. Гідроксил-радикал може запускати процес перекисного окислення ліпідів із утворенням ліпідних радикалів. У результаті всіх цих реакцій у клітинах утворюється сукупність дуже агресивних сполук ($-\text{OO}$, HOOH , $\cdot\text{OH}$ та інші), які були названі активними формами кисню (АФК), до числа яких іноді відносять також гіпохлорит ClO^- і активні форми азоту – вищі оксиди азоту і пероксинітрит.

У поняття АФК дослідники включають різне число сполук, так чи інакше пов'язаних із первинним утворенням САР. Аналізуючи детально проведені дослідження, список мав би виглядати наступним чином: супероксид, гідроксил радикал, пероксид водню, синглетний кисень і озон.

Оксидативний стрес проявляється в накопиченні пошкоджених основ ДНК, продуктів окислення білків і пероксидації ліпідів, а також у зниженні рівня антиоксидантів і пов'язаній із цим підвищеній сприйнятливості ліпідів мембран і ліпопротеїнів до дії прооксидантів, включаючи іони Fe^{2+} або H_2O_2 . Невизначеність терміну «оксидативний стрес» пов'язана як із тим, що обидва поняття – прооксиданти і антиоксиданти – дуже розпливчасті, так і з тим, що неясно, де закінчується баланс і починається дисбаланс. Нижче наведена конкретна схема формування радіаційно-індукованих ушкоджень соматичних клітин шляхом розвитку оксидативного стресу (рис. 2.2) .

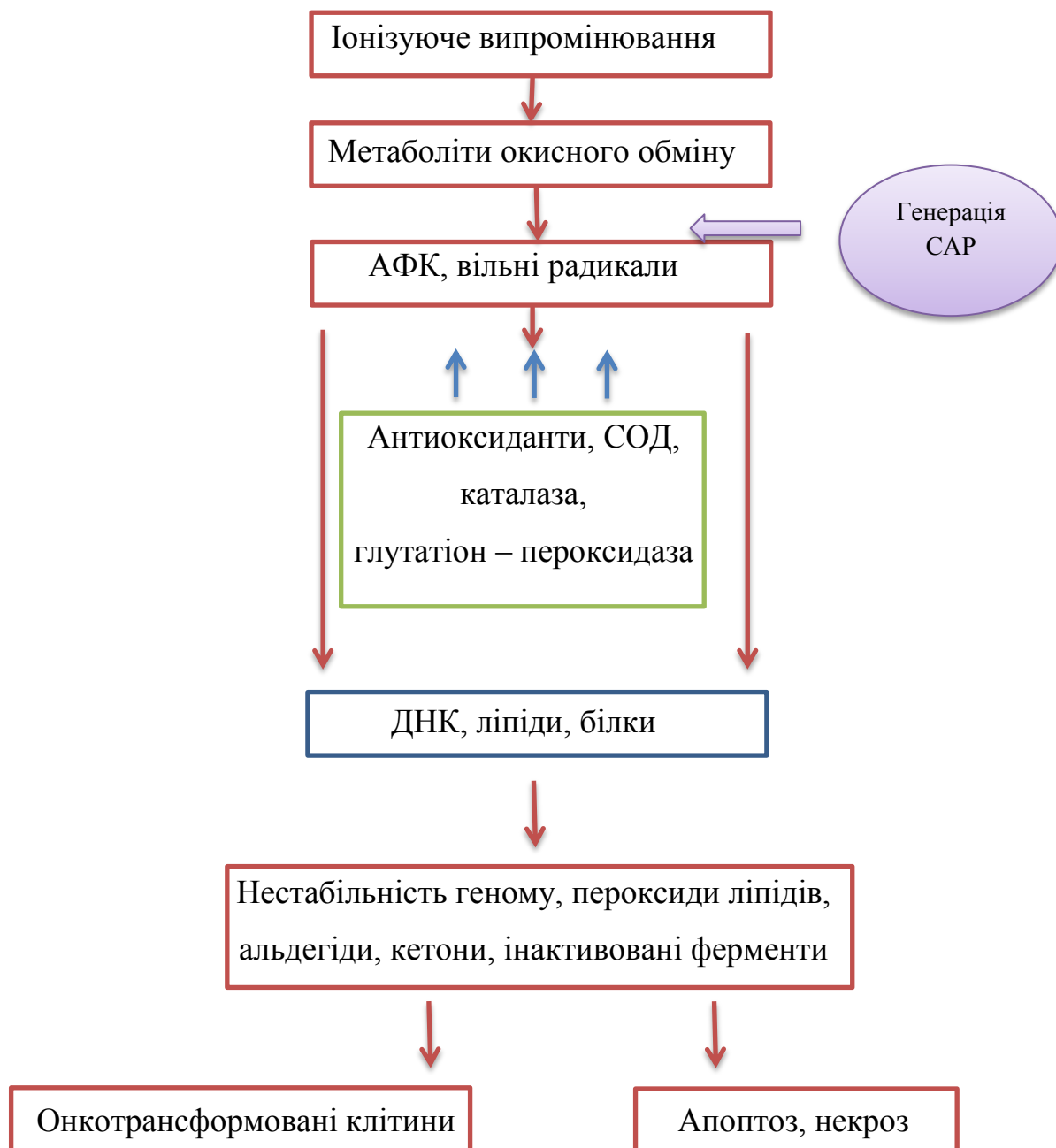


Рис. 2.2. Схема формування радіаційно-індукованих ушкоджень соматичних клітин шляхом розвитку оксидативного стресу.

Визначення інтенсивності генерування САР виконували із використанням методу ХЛ та люцигенінового зонду. Деталі методу представлені нижче.

2.4.1.1. Виділення лімфоцитів периферичної крові. Спочатку був зроблений забір венозної крові, для якого використали одноразові стерильні шприци (10 мл). Відбирали 8,0 мл крові одразу. Для запобігання процесів згортання крові, зразки поміщали у вакутайнери із гепариновим напиленням. Далі помітили пробірки особистим номером донора.

Наступним етапом було здійснено опромінення крові в Національному інституті раку МОЗ України на «РУМ-17» – експериментальній рентгенівській установці, потужність дози на якій становила 0,89 Гр/хв., напруга – 180 кВ, при цьому використовувався фільтр – 0,5 мм Си. Оскільки дана робота пов'язана з дослідженням ефектів малих доз, то дози опромінення склали 0,1 Гр, 0,3 Гр, 0,5 Гр безпосередньо. Контролем слугували інтактні проби крові для кожного донора або пацієнта.

Далі зразки знову доставляли у відділ біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання для виділення ЛПК, яке виконували на розчині Гістопак-1077 HYBRY-MAX, згідно з інструкцією виробника (BioReagent).

Спочатку кров у обсязі 2 мл на одне спостереження для одного пацієнта або донора розбавляли фізіологічним розчином (1:1). Після розбавлення пробу нашаровували на 2 мл Гістопак-1077 HYBRY-MAX (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Нашарування крові на Гістопак-1077 HYBRY-MAX.

Далі було проведене центрифугування зразка (1000 об./хв.) впродовж 40 хвилин. Після завершення центрифугування утворювався шар із лімфоцитів, який відбирали в нові пробірки. До цих самих пробірок додали 2 мл фізіологічного розчину. Зразок перемішували за допомогою вортексу та знову центрифугували (1000 об./хв.) впродовж 10 хвилин. Після завершення даного етапу обережно зливали супернатант та повторили промивання та центрифугування ще раз за тих самих умов. Після повторного завершення останнього етапу додали в кожен зразок по 800 мкл фізіологічного розчину.

2.4.1.2. Підрахунок кількості клітин у камері Горяєва та їх розведення до необхідної концентрації. Для того, щоб було можливим визначення швидкості генерування САР методом ХЛ із використанням люцигеніну на автоматичному люмінометрі з ланцюговим механізмом Autolumat LB 953, потрібно спочатку розвести зразки до необхідної концентрації (1 млн/мл). Для цього етапу камеру Горяєва та шліфоване покривне скло промивали водою та насухо витирали марлею. Шліфоване покривне скло притирали до камери аж до появи райдужних ньютонівих кілець.

Далі зразки клітин ретельно перемішували на вортексі та вносили 30 мкл їх суспензії в 96-лунковий планшет. Також у дану лунку додавали 30 мкл розчину трипанового синього. Отриману суміш перемішували дозатором. Після цього дозатором вносили рідину з клітинами на камеру Горяєва з самого краю покривного скла так, щоб вона повністю заповнилась. Важливо, що підрахунок клітин проводиться через три хвилини після повного заповнення камери.

Помістивши препарат під мікроскоп, знаходили сітку камери та проводили підрахунок клітин. Підрахунку підлягали клітини, які лежали всередині квадратів. Якщо були наявні клітини на перетині сторін квадратів, то рахували таким чином: якщо більша частина клітини знаходилася всередині квадрата – то її рахували, якщо поза ним – то ні. Якщо ж були препарати, на яких спостерігалася занадто велика кількість клітин, то в

такому разі підрахунок неможливий – готували новий зразок із більшим розведенням клітин зразка розчином трипанового синього. Після закінчення підрахунку камеру та покривне скло ретельно промивали водою та висушували.

Після завершення етапу підрахунку отримували значення кількості клітин у камері Горяєва. Далі за допомогою формули (2.1) розраховували концентрацію клітин у зразках.

$$Y = \frac{X \times R \times 100 \times 4000}{N \times 1600 \times 1000} \quad (2.1)$$

де Y – концентрація клітин у зразку, млн. /мл;

X – кількість підрахованих клітин;

R – розведення зразка трипановим синім;

N – кількість великих квадратів, у яких були підраховані клітини;

100 – стандартна кількість великих квадратів, у яких рахують клітини;

1000 – коефіцієнт перерахунку в млн. клітин на мл;

4000 та 1600 – коефіцієнти для підрахунку клітин згідно з розмірами та об'ємами великих квадратів камери Горяєва.

2.4.1.3. Визначення швидкості генерування супероксидного аніон-радикала хемолюмінесцентним методом із використанням люцигеніну на автоматичному люмінометрі з ланцюговим механізмом Autolumat LB 953. Як відомо, безпосередній хімічний аналіз радикалів неможливий тому, що на відміну від звичайних молекул, їх не можна ні виділити, ні очистити внаслідок величезної реакційної здатності. Зазвичай визначають стійкі молекулярні продукти реакцій, у яких брали участь радикали.

У даній роботі був використаний метод ХЛ, оскільки він є дуже чутливий до виявлення високореакційних радикалів.

Прилад, який використовувався для визначення швидкості генерування САР, це автоматичний люмінометр із ланцюговим механізмом Autolumat LB 953 (рис. 2.4).



Рис. 2.4. Автоматичний люмінометр із ланцюговим механізмом Autolumat LB 953.

Автоматичний люмінометр Autolumat – це універсальний прилад, сконструйований для аналізів репортерного гена, а також для широкого кола застосувань, таких як вимірювання АТФ, імунні аналізи, аналізи ДНК вимірювання ферментів. Автоматичний механізм для зміни зразків, розрахований на максимум 164 зразків, дозволяє проводити одноразовий або повторний аналіз однієї серії зразків (рис. 2.5).

Інтенсивність люмінесценції свідчить про швидкість окисного метаболізму в клітинах, оскільки кисень головним чином використовується для вироблення аденозинтрифосфату (АТФ) у дихальному ланцюзі мітохондрій. Вимірювання здійснювали на приладі впродовж 72 с (18 вимірів з інтервалом 4 с). Для цього у кювету вносили 40 мкл люцигеніну (який допомагає збільшити люмінесценцію, для кращої можливості фіксування її приладом), безпосередньо перед вимірюванням додавали 1 мл суспензії

клітин у концентрації 1 млн./мл. Записували світлосуму ($\Sigma 72$) реакції за 72 с (імп./72 с).



Рис. 2.5. Автоматичний люмінометр Autolumat LB 953 – вигляд зсередини.

За допомогою отриманих даних можна аналізувати, в якому стані знаходиться оксидантна система клітин у певного хворого, як вона справляється із поступовим збільшенням дози ІВ та визначати, на якому етапі оксидантні системи починають реагувати або навпаки, продовжують не реагувати на ІВ. Також завдяки цьому методу можна розподіляти людей на групи більш радіочутливих та менш радіочутливих, а також правильно корегувати радіотерапію в онкохворих пацієнтів.

2.4.2. Напівмікрометод культивування лімфоцитів крові з метафазним аналізом аберацій хромосом. Експеримент проводили згідно з міжнародним стандартним протоколом (IAEA, 2011). Для культивування ЛПК застосовувався напівмікрометод із деякими модифікаціями [82].

Спочатку був зроблений забір венозної крові, для якого використали одноразові стерильні шприци (10 мл). Для запобігання процесів згортання крові, зразки поміщали у вакутайнери із гепариновим наповненням. Далі помітили пробірки особистим номером донора.

Наступним етапом було здійснено опромінення крові в Національному інституті раку МОЗ України на «РУМ-17» експериментальній рентгенівській установці, потужність дози на якій становила 0,89 Гр/хв., напруга – 180 кВ, при цьому використовувався фільтр – 0,5 мм Cu. Оскільки дана робота пов'язана з дослідженням ефектів малих доз, то дози опромінення склали 0,1 Гр, 0,3 Гр, 0,5 Гр безпосередньо. Опромінення зразків крові донорів здійснювали на G₀-стадії клітинного циклу, після чого пробірки з культурою клітин поміщали в термостат для культивування при температурі +37°C. Контролем слугували інтактні зразки крові для кожного донора або пацієнта.

Далі зразки знову були доставлені в лабораторію відділення радіобіологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання для проведення культивування.

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

Для початку були приготовані стерильні пробірки для аналізу зразків крові кожного донора та пацієнта. Наступним кроком було додавання 4,5 мл живильного середовища RPMI-1640, завчасно підігрітого до кімнатної температури, одноразовим шприцом (5 мл) до стерильної пробірки. У культуральне середовище додавали 0,1 мл мітогену фітогемаглютиніну (PHA-M). І тільки в останню чергу до пробірки додавали 0,5 мл крові донора або пацієнта. Далі пробірки розташовували на лабораторному штативі, який заздалегідь продезінфікували, та переносили до термостату. Важливо, щоб штатив був під кутом нахилу 45° та культивування проходило при температурі +37°C протягом 52 годин .

2.4.2.2. Фіксація культури лімфоцитів крові людини. Наступним етапом було додавання 0,59 мкл колцеміду до зразків на 49-й годині від початку культивування для накопичення метафаз. Потім інкубували ще протягом трьох годин.

Як тільки час культивування становив 52 години, культивування припиняли, а зразки відправляли на центрифугування (1500 об./хв) на 10 хвилин. Після завершення центрифугування збирали супернатант, залишаючи 1 мл рідини, яку потім перемішували з осадом за допомогою вортексу. Далі додали розчин гіпотонії (0,55 М КСІ) – 7 мл та відправляли до термостату при температурі +37°C на 25 хв. Після цього пробірки з гіпотонією центрифугували (1500 об./хв) 10 хвилин та після закінчення знову збирали супернатант, залишаючи 1 мл рідини. Перемішавши суміш на вортексі, додавали 5 мл фіксатора (знову ж таки добре перемішували). Поставили зразки на лабораторний штатив.

Штатив розміщували у холодильнику під нахилом 45° та охолоджували при температурі +4 °С 10 хвилин. Після цього виймали штатив та відбирали супернатант, залишаючи 1 мл рідини до осаду. Дана процедура повторювалась до моменту повного очищення осаду, а саме, набуття ним білого кольору (в середньому 3-4 рази). Як тільки отримували бажаний результат, відбирали супернатант, залишаючи в пробірці до 0,5 мл фіксатора. Осад далі був перемішаний за допомогою вортекса.

Важливий момент: для приготування цитогенетичних препаратів використовували предметні скельця Super Frost. Було проведене їх знежирювання за допомогою промивання дистильованою водою та содою. Надалі скельця були охолоджені протягом 10 хвилин.

Після завершення вищеописаних етапів все було готове для розкрапування суспензії клітин на скельця (це робили під витяжною шафою). Спочатку ресуспендували за допомогою дозатора отриманий зразок клітин. Скло тримали горизонтально та фіксували препарат над полум'ям газового пальника (щоб хромосоми рівномірно розташовувались на предметному склі). Далі, залишивши препарати на поверхні під витяжною шафою, давали їм таким чином висохнути. Слід промаркувати кожне предметне скло, а також бажано готувати 2-3 препарати для кожного зразка окремого донора або пацієнта. Пробірки із зафіксованими клітинами зберігаються в

холодильнику впродовж проведення усіх подальших стадій дослідження до моменту отримання кінцевих результатів. Після проведення експериментальних досліджень пробірки, як правило, знезаражуються та підлягають утилізації.

2.4.2.3. Гідроліз та забарвлення цитогенетичних препаратів.

Наступним етапом після висихання препаратів був їх гідроліз. Під витяжною шафою додавали 5 Н HCl в чашку Петрі та занурювали туди предметні скельця (залишили там на 7-11 хв.). Після цього пінцетом діставали препарати та промивали їх водою (проточною та дистильованою) і висушували (теж під витяжною шафою).

Рівномірне забарвлення препаратів проводили за допомогою барвника Романовського-Гімза (2 %). Протягом 7-12 хвилин проводили забарвлення препаратів у спеціальній ємності. Після завершення встановленого часу висушили зразки приблизно протягом однієї години до повного висихання [83].

2.4.2.4. Цитогенетичний аналіз отриманих препаратів.

Аналіз препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа. Головним критерієм відбору метафазних пластинок та хромосом є їх якість (рис. 2.6).

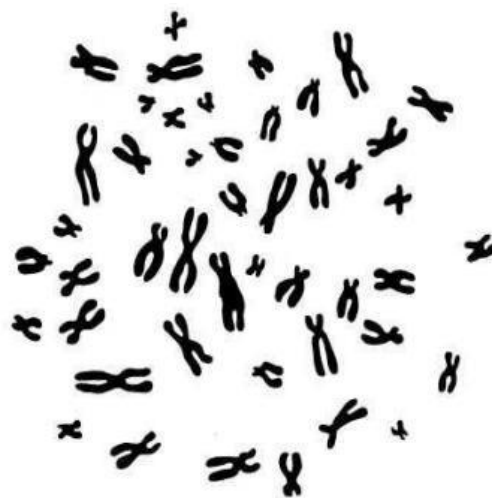


Рис. 2.6. Нормальний каріотип (46 хромосом) хромосомної пластинки (збільшення x 1000).

Аналізували 100-200 хромосомних пластинок при кожному спостереженні. Важливо, щоб метафазна пластинка містила 46 ± 1 хромосому.

Щоб визначити загальні критерії, такі як загальна кількість метафаз, густина розкрапування, якість забарвлення, аналізували препарати за умов малого збільшення, тобто $\times 10$ та $\times 20$. Щоб зрозуміти, чи придатна хромосомна пластинка для проведення аналізу, використовувати об'єктив $\times 40$. А вже для детального вивчення препарати досліджували, використовуючи імерсійний об'єктив ($\times 100$) у середовищі імерсійної олії.

Основною умовою при відборі пластинок була мінімізація числа накладань хромосом одна на одну, оскільки скупчення хромосом ускладнюють аналіз аберацій хромосом. Тому логічно, що для аналізу відбиралися пластинки, у яких можна явно виокремити центромерні ділянки.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив малих доз іонізуючого випромінювання на генерування супероксидного аніон-радикала в лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію

На сьогодні в більшості випадків, коли люди зазнають впливу ІВ, як від природних, так і техногенних джерел, мова іде про опромінення в малих (надфонових) дозах. Тому головну стурбованість викликають наслідки радіаційної дії в малих дозах, насамперед, канцерогенні ефекти, а також ураження здорових клітин із оточення опромінюваної мішені-пухлини.

В огляді літератури вже було проаналізовано, що ЛПК є однією з найбільш чутливих функціональних ланок в організмі, й їх реакцію на дію різних факторів зовнішнього середовища перш за все можна спостерігати у зміні окисного метаболізму. Роль АФК є двосторонньою, тобто вона може бути як позитивною, так і негативною. Наприклад, АФК можуть бути пусковими чинниками в утворенні патологічних перетворень у клітині та ініціюючими чинниками у процесах адаптації клітини до дії різноманітних зовнішніх та внутрішніх факторів.

Важливим показником у цій роботі є рівень інтенсивності вільно-радикальних процесів у тканинах організму. Адже збільшене утворення вільних радикалів є головним механізмом формування структурно-функціональних ушкоджень клітини, а також розвиток оксидативного стресу. Як вже відзначено, пусковим механізмом ініціації вільно-радикальних процесів є генерація САР у хімічних реакціях, а в основному внаслідок утворення АТФ у мітохондріях.

У дослідженні [84] було описано такі результати: при опроміненні зразків крові в діапазоні доз від 0,5 до 3,0 Гр у донорів за швидкістю генерування САР ЛПК (дані до тестуючого опромінення) було відзначено

широку варіабельність даних – 506-2600 імп./72 с. Дослідження характеру кривих «доза-ефект» за цим показником виявило залежність реакції відповіді на опромінення від вихідного рівня інтенсивності генерування САР. Дана варіація даних представила можливість розподілу донорів на групи: з низькою (500-750 імп./72с), середньою (750-1100 імп./72с) та високою (вище 1100 імп./72с) інтенсивністю генерування САР ЛПК. Низькі рівні САР свідчать про збалансованість окисно-відновних процесів та їх утримання в межах фізіологічної норми; високі швидкості генерування САР – про порушення редокс-потенціалу в бік розвитку оксидативного стресу. За цим самим розподілом одержані нами результати інтенсивності генерування САР можна віднести до групи середньої інтенсивності.

Нами було проведено дослідження інтенсивності генерування САР лімфоцитами крові умовно здорових осіб та осіб, хворих на РЕ. Показано (рис. 3.1), що до початку протипухлинної терапії інтенсивність генерування САР лімфоцитами хворих на РЕ перевищує значення цього показника здорового контролю в 1,5 разу (781,6 імп./72с та 551,5 імп./72с, відповідно) та відповідає середній інтенсивності та за даними Дружини М.О. та співавт. (2020). На наш погляд, підвищення генерації САР лімфоцитами хворих може свідчити про системне запалення, яке супроводжує процеси онкогенезу.

Схожі результати були отримані в роботі Смоланки І.І., Михайленка В.М., Дружини М.О. [85]. Авторами зазначено, що при дослідженні інтенсивності генерування САР лімфоцитами крові виявлено її підвищення в 1,3 разу у хворих із передпухлинною патологією МЗ порівняно зі значенням в умовно здорових осіб ($924,3 \pm 76,4$ та $703,7 \pm 47,5$ імп./72 с, відповідно).

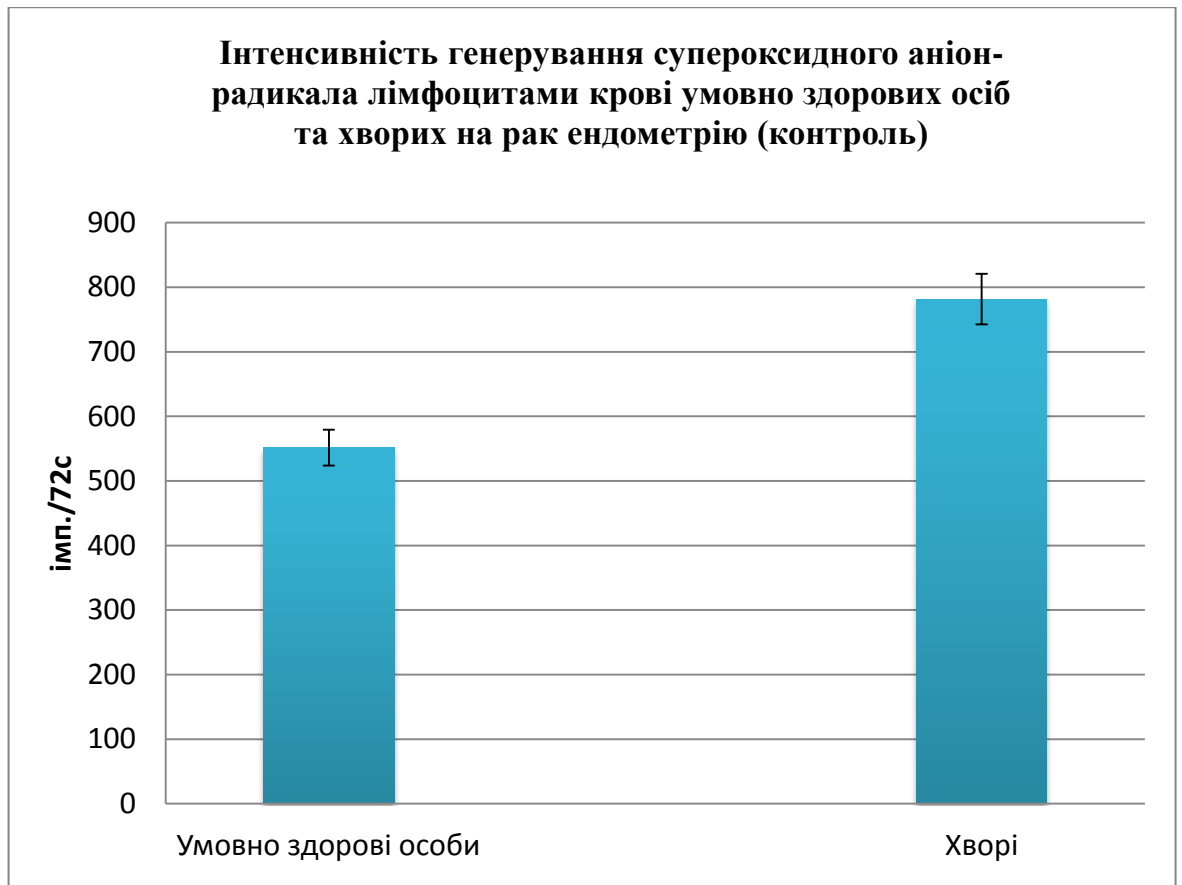


Рис. 3.1. Інтенсивність генерування САР лімфоцитами крові умовно здорових осіб та хворих на РЕ.

При тестуючому рентгенівському опроміненні зразків крові хворих на РЕ в діапазоні доз 0,1-0,5 Гр отримано калібрувальні дозові криві (рис. 3.2.).

У рамках виконаного дослідження найбільше значення біохімічного показника САР відмічається при опроміненні в дозі 0,1 Гр, що перевищує значення аналогічного показника ЛПК здорових донорів в 1,4 разу. Із підвищенням дози опромінення (0,3-0,5 Гр) крива виходить на плато. Така ж картина спостерігається при обстеженні опроміненої крові здорових донорів (рис. 3.2), що свідчить про не випадковість таких результатів. Для радіобіологічного тлумачення такого характеру дозових кривих потрібно продовження виконання досліджень в цьому напрямку з використанням цитогенетичного біодозиметра – дозової залежності частоти аберацій хромосом при опроміненні культури ЛПК в діапазоні малих доз.

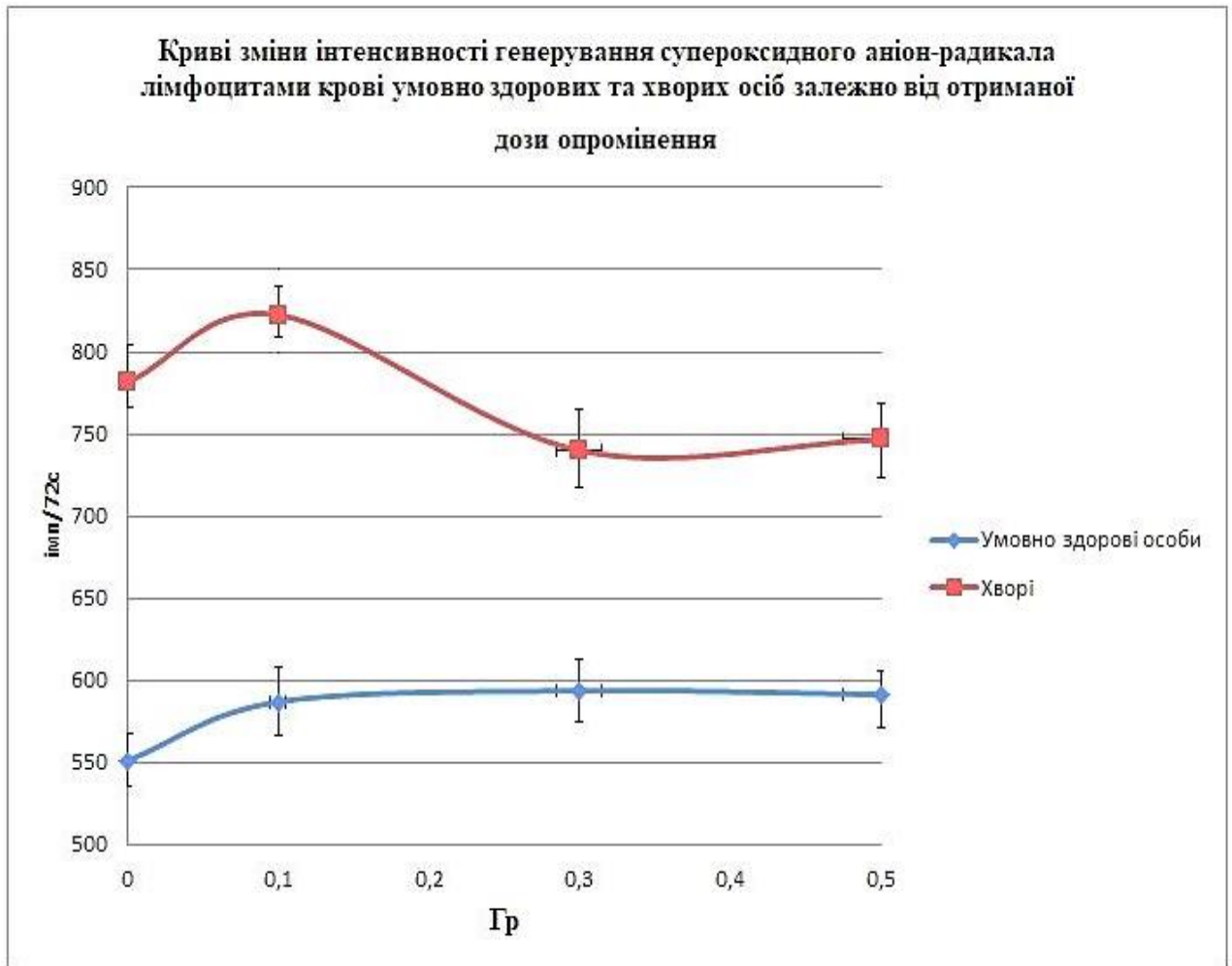


Рис. 3.2. Інтенсивність генерування САР лімфоцитами крові умовно здорових осіб та хворих на РЕ за умов тестуючого опромінення в діапазоні доз 0,1-0,5 Гр.

3.2. Частота і спектр аберацій хромосом у лімфоцитах крові хворих на рак ендометрію за умов дії малих доз іонізуючого випромінювання

Аналіз отриманих препаратів хромосом проводили за допомогою світлового мікроскопа. Головним критерієм відбору метафазних пластинок та хромосом була їхня якість. Аналізували 100-200 хромосомних пластинок при

кожному спостереженні. Важливо, щоб метафазна пластинка містила 46 ± 1 хромосому.

Важливо, що для кожного окремого зразка пацієнта визначали спонтанний рівень аберацій та його зміни після дії ІВ. Для цієї мети досліджувались такі показники, як частота абераційних клітин (%), загальна частота аберацій хромосом, перебудови хромосомного та хроматидного типу, а також різноманітні фрагменти та обміни.

За результатами аналізу фіксували аберації хроматидного типу – ізоделеції, делеції та міжхромосомні обміни, а також визначали рівень аберацій хромосомного типу (шляхом підрахунку рівня аберацій хромосомного типу перед та після впливу ІВ).

Виділяють такі типи хромосомних аберацій, як ацентричні кільця, транслокації, центричні кільця, а також дицентричні хромосоми та парні фрагменти (рис. 3.3) [86].

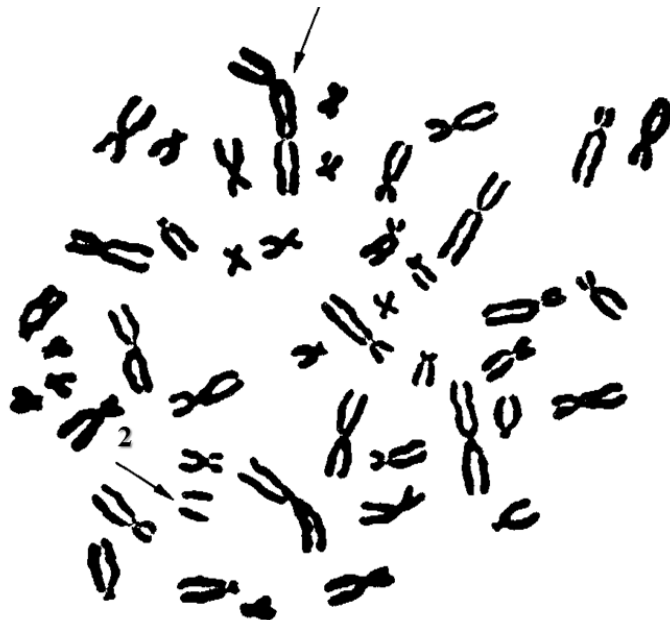


Рис. 3.3. Мікрофото метафазної пластинки: 1 – дицентрична хромосома, 2 – супроводжуючий парний фрагмент позначені стрілками.

Дослідження залежності «доза-ефект» при опроміненні *in vitro* ЛПК хворих на РЕ потребує в першу чергу вивчення характеристики спонтанного рівня хромосомних перебудов у цих клітинах до початку протипухлинної терапії. Результати аналізу спонтанного рівня аберацій хромосом у ЛПК хворих представлено у Табл. 3.1.

Середня частота аберантних ЛПК обстежених первинних хворих на РЕ становила $7,00 \pm 0,83$ % і перевищувала більше ніж у два рази верхню межу середньопопуляційного рівня [87]. Загальна частота аберацій хромосом у групі хворих становила $7,48 \pm 0,95$ на 100 клітин, тобто 1,07 на аберантну клітину та перевищувала в 7 разів контрольне значення цього показника ($1,10 \pm 0,40$).

Серед виявлених спонтанних перебудов 70 склали аберації хроматидного типу. Відношення частоти аберацій хроматидного та хромосомного типів склало 2,2. Аберації хроматидного типу в основному (96,5 %) представлені хроматидними фрагментами, частота яких дорівнювала $4,5 \pm 0,74$ на 100 метафаз. Це достовірно ($p \leq 0,05$) перевищувало значення цитогенетичного показника здорового контролю – в середньому більше ніж у 5 разів (Табл. 3.1).

На відміну від контролю, особливістю спектру спонтанних аберацій виявлених у ЛПК хворих на РЕ була поява нестабільних аберацій обмінного типу (у 55 % обстежених пацієнтів): дицентричних хромосом (0,16 на 100 метафаз), кільцевих та аномальних хромосом (0,18 на 100 метафаз та 0,25 на 100 метафаз, відповідно). При цьому в ЛПК онкологічних хворих реєстрували індивідуальні розбіжності частоти аберацій хромосом від 2,17 на 100 метафаз до 15,00 на 100 метафаз, відповідно.

Таким чином, цитогенетичний статус ЛПК хворих на РЕ до початку протипухлинної терапії характеризується підвищеним рівнем аберантних клітин та загальної частоти перебудов хромосом у співставленні з даними здорового контролю, а також появою у спектрі спонтанних обмінів хромосомного типу.

Таблиця 3.1.

Основні статистичні параметри цитогенетичних показників ЛПК хворих на РЕ до початку променевої терапії (середньогрупові значення)

Цитогенетичний показник / 100 метафаз	Середнє значення	Мінімум	Максимум	Стандартне відхилення	Стандартна похибка
Аберантні метафази	7,0	2,17	14	2,81	0,83
Загальна частота аберацій хромосом	7,48	2,17	15	3,15	0,95
Частота аберацій хроматидного типу	5,0	1,45	11	2,54	0,75
Частота аберацій хроматидного типу	2,48	0,75	4,0	1,14	0,35
Дицентричні хромосоми	0,16	0	1	0,38	0,12
Кільцеві хромосоми	0,18	0	1	0,39	0,13
Аномальні хромосоми (транслокації)	0,26	0	1,18	0,48	0,14
Хромосомні (парні) фрагменти	0,51	0	2	0,66	0,21

ІВ викликає великий вихід тяжкорепараційних двониткових розривів, збільшує кількість трансформованих клітин із різними, в тому числі онкогенними, потенціями і тому характеризується як сильний ініціатор та промотор радіогенного раку [88,89].

Найбільшу зацікавленість викликає вплив малих доз ІВ, оскільки саме ефекти малих доз є промоторами канцерогенезу – спостерігається менше виражена загибель клітин, через що процеси репарації не стимульовані

клітинною загибеллю; а також вплив радіації на процеси онкогенезу в діапазоні малих доз може бути більшим на одиницю дози порівняно з ефектом великих доз і в цьому разі РІНГ змінює чутливість опромінених клітин до дії інших факторів [90,91].

Зареєстроване нами підвищення генетичних змін в немалігнізованих клітинах хворих можна розглядати як вплив процесу онкогенезу на репаративні процеси, через що спонтанно–індуковані пошкодження значною мірою не відновлюються [92].

Не можна також виключати в минулому контакт пацієнтів із джерелом ІВ, можливо, за рахунок частого використання методів променевої терапії [93], які можуть бути причиною індукції в ЛПК опромінених осіб довго існуючих перетворень хромосом. За даними літератури [94], зміна лімфоцитів відбувається протягом декількох місяців, і тільки частина їх можуть знаходитись у циркулюючій крові роками чи десятиліттями.

У нашому дослідженні більшість ЛПК із дицентриками не мали супроводжуючих парних фрагментів, що свідчить про їх втрату в процесі мітозу. Підтримання пулу аберантних ЛПК з найбільшою ймовірністю зумовлено продукцією їх стовбуровими кістковомозковими клітинами, в кодї ДНК яких уже закладені радіаційні пошкодження. Тому якщо більшість хромосомних обмінів зустрічається без супроводжуючих фрагментів, то це можна розглядати як результат відтворювання їх дискредитованими стовбуровими клітинами.

Одержані нами дані стосовно спектру і частоти спонтанних аберацій у ЛПК хворих на РЕ до початку протипухлинної терапії виявились підґрунтям при оцінці ефектів, індукованих опроміненням *in vitro* в діапазоні малих доз (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Дослідження залежності «доза-ефект» для різних типів аберацій хромосом у культурі ЛПК хворих на РЕ при тестуючому опроміненні в діапазоні доз 0,1 – 1,0 Гр (середньогрупові значення)

Цитогенетичний показник / 100 метафаз	Доза опромінення, Гр					
	0	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0
Частота абераційних лімфоцитів, %	7,0 ± 0,83	10,6±4,0	12,9±4,1	15,5±3,2	8,2±4,7	36,0±5,5
Загальна частота аберацій хромосом	7,48±2,17	12,6±4,0	15,0±3,9	18,0±4,5	19,2±5,7	40,0±7,9
Аберації хроматидного типу	5,0 ± 0,75	9,2±0,44	10,3±0,81	11,5±0,81	12,2±0,79	14,0±1,2
Частота аберацій хромосомного типу	2,48±0,35	3,4±0,9	4,7±1,7	7,5±1,8	7,0±2,0	26,0±3,2
Дицентричні хромосоми	0,16±0,12	0,4±0,2	0,8±0,3	1,5±0,6	1,8±0,9	10,0±4,1
Кільцеві хромосоми	0,18±0,13	0,1	0,1	0,8	1,0	1,0
Аномальні хромосоми (транслокації)	0,26±0,14	0,4±0,03	0,9±0,04	1,2±0,05	1,7±0,08	1,5±0,06
Хромосомні (парні) фрагменти	0,51±0,21	2,5±0,36	1,4±0,44	2,0± 0,98	2,5±1,2	11±3,8

Так, аналіз спектру та частоти радіаційно-індукованих пошкоджень хромосом крові хворих показав наступне:

— при дозі рентгенівського опромінення 0,1 Гр співвідношення аберацій хроматидного та хромосомного типів склало 2,7 (9,2 на 100 метафаз та 3,4 на 100 метафаз, відповідно);

— відношення аберацій – обмінів до фрагментів при дозі опромінення 0,1 Гр склало 1,2; із підвищенням дози становило вже 2,1;

— частота променевих маркерів (дицентриків) у діапазоні доз 0,1 – 1,0 Гр зростає приблизно у 25 разів, а парних фрагментів – всього у 4,4 рази. Тобто, відповідно до парадигм класичної радіаційної цитогенетики, рівень променевих маркерів у крові первинних хворих на РЕ із дозою опромінення зростає більш інтенсивно, ніж фрагментів. Більше того, він перевищує аналогічний показник здорового контролю;

— дицентричні хромосоми є дозозалежними показниками, оскільки, починаючи з дози 0,5 Гр (верхня межа діапазону малих доз), їхня частота перевищує 1;

— найбільш важливим результатом роботи є той факт, що при тестуючому опроміненні ЛПК хворих у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр для всіх цитогенетичних показників (окрім аберацій хроматидного типу), в першу чергу для дицентриків, на кривій «доза-ефект» в інтервалі малих доз (0,1-0,5 Гр) реєструється плато, тобто дозозалежна ділянка.

Вперше встановлено, що аномальний характер дозових кривих для цитогенетичних показників співпадає з даними біохімічного фрагменту роботи, які також свідчать про наявність плато в цьому ж діапазоні доз (див. рис. 3.2).

На рис. 3.4. представлено дані щодо частоти радіаційно-індукованих аберацій хромосом у ЛПК хворих на РЕ.

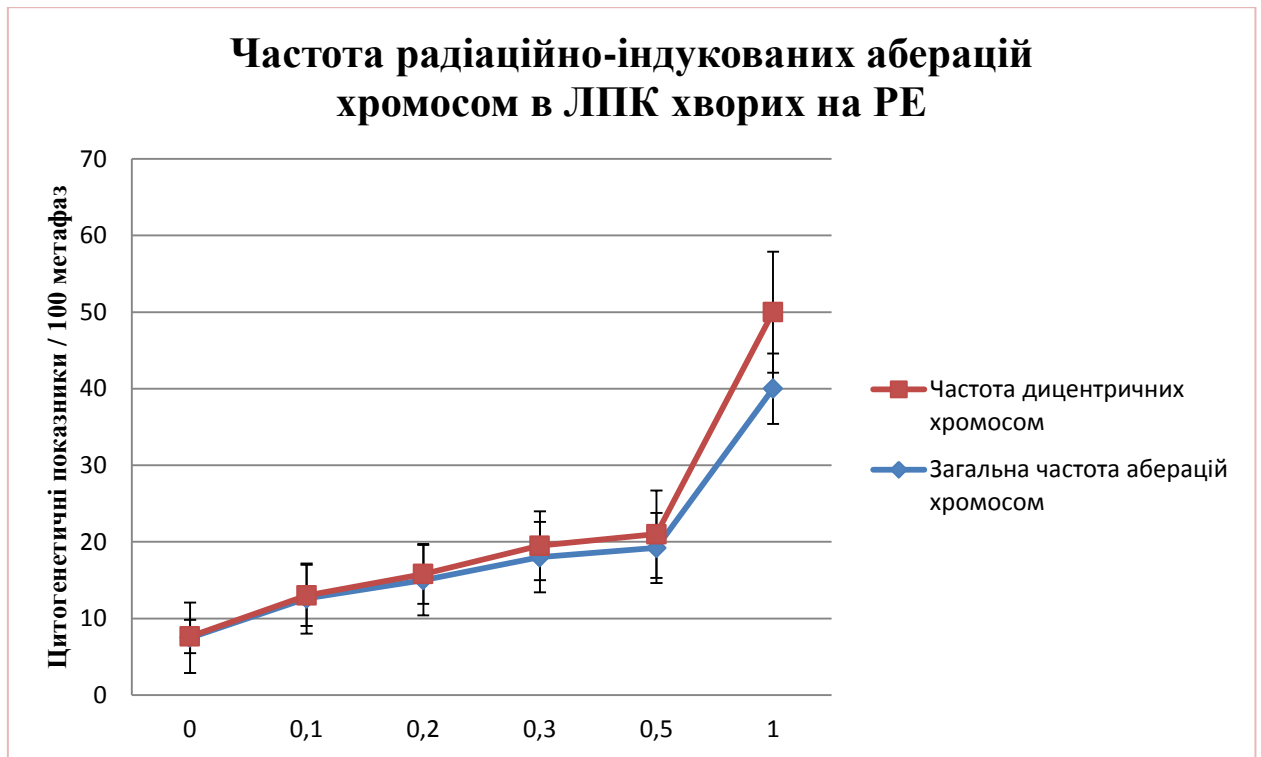


Рис. 3.4. Частота радіаційно-індукованих аберацій хромосом у ЛПК хворих на РЕ: 1 – загальна частота аберацій хромосом, 2 – частота дицентричних хромосом.

Наступним етапом роботи було дослідження мітотичної активності лімфоцитів крові хворих на РЕ в залежності від малих доз опромінення. Враховуючи, що ЛПК – це імунокомпетентні високорадіочутливі клітини, які здійснюють нагляд за антигенною сталістю внутрішнього середовища організму, в якості додаткового показника ефектів малих доз ІВ було проаналізовано залежність мітотичного потенціалу цих клітин хворих на РЕ від ступеня променевого навантаження.

Значення мітотичного індексу використали в якості показника проліферативної активності лімфоцитів. Для цього було визначено частину ядер, які перебували на стадії мітозу. З метою зменшення величини стандартної похибки було проаналізовано 2000–3000 клітин на кожне спостереження [95].

Даний мітотичний індекс, який є показником мітотичної активності ЛПК, було визначено в проміле за наступною формулою (3.1):

$$M_i = M1/M2 \times 1000 \text{ ‰}, \quad (3.1)$$

де M1 – кількість клітин в стадії метафази;

M2 – загальна кількість бластних клітин.

За рахунок дотримання методичних вказівок та розрахунку мітотичного індексу було встановлено, що в діапазоні доз 0,1-1,0 Гр відзначається спочатку достовірно ($p \leq 0,05$) пригнічення мітотичної активності порівняно з неопроміненим контролем (рис. 3.5). Це свідчить про негативний вплив опромінення в малих дозах (0,1-0,3 Гр) на проліферативний потенціал ЛПК.

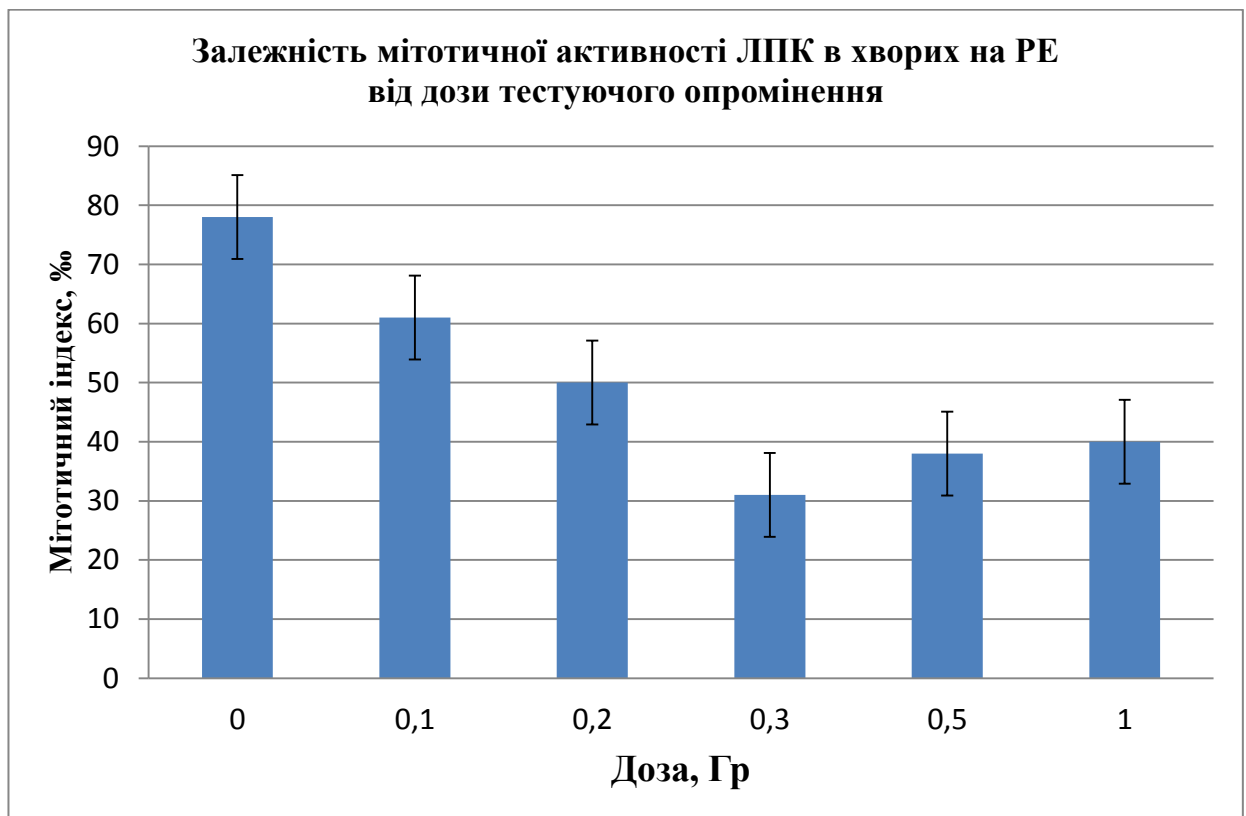


Рис. 3.5. Залежність мітотичної активності ЛПК у хворих на РЕ від дози тестуючого опромінення (0,1-1,0 Гр).

Надалі з підвищенням дози опромінення (до 1,0 Гр) на дозовій кривій зареєстровано плато, яке розташовано значно нижче за контрольні значення показника ($17,40 \pm 3,96$ ‰ проти $30,94 \pm 3,72$ ‰).

Отримані нами дані свідчать про те, що мітотична активність ЛПК хворих ще до початку протипухлинної терапії пригнічена, порівняно зі здоровим контролем, що може бути наслідком імудодепресії, притаманної для онкогенезу. На побудованій нами дозовій кривій реєструється плато, яке свідчить, що малі дози ІВ пригнічують здатність ЛПК онкологічних хворих до бластотрансформації, що відповідно до даних літератури [96] негативно впливає на їхню функціональну активність.

Отже, у результаті проведених досліджень була опрацьована тест-система ЛПК людини відповідно до стандартного міжнародного протоколу для дослідження ефектів малих доз ІВ на біохімічні та цитогенетичні показники хворих на РЕ. Було виявлено, що до початку протипухлинної терапії інтенсивність генерування САР лімфоцитами крові хворих на РЕ перевищує значення цього показника у здорового контролю в 1,5 разу та відповідає середній інтенсивності. Найбільше значення біохімічного показника САР відмічається при тестуючому опроміненні в дозі 0,1 Гр, що перевищує значення аналогічного показника ЛПК здорових донорів в 1,4 разу.

З'ясувалося, що при дозі рентгенівського опромінення 0,1 Гр співвідношення аберацій хроматидного та хромосомного типів у ЛПК хворих на РЕ склало 2,7, відношення аберацій-обмінів до фрагментів при даній дозі опромінення – 1,2. Частота променевих маркерів (дицентриків) у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр зростає приблизно у 25 разів, а парних фрагментів – у 4,4 разу. Частота дицентричних хромосом починаючи з дози 0,5 Гр перевищує 1, що дозволяє назвати їх додозалежними показниками. У той же час у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр відмічається достовірне пригнічення мітотичної активності ЛПК хворих порівняно з неопроміненим контролем, що свідчить про

негативний вплив опромінення в малих дозах (0,1-0,3 Гр) на проліферативний потенціал лімфоцитів.

Встановлено, що аномальний характер дозових кривих для цитогенетичних показників співпадає з даними біохімічних досліджень, які також свідчать про наявність плато в цьому ж діапазоні доз. При тестуючому опроміненні ЛПК хворих в діапазоні доз 0,1 – 1,0 Гр для всіх цитогенетичних показників, окрім аберацій хроматидного типу, на кривій «доза-ефект» в інтервалі малих доз (0,1-0,5 Гр) реєструється плато, тобто дозозалежна ділянка. Дозова крива мітотичної активності ЛПК із підвищенням дози опромінення до 1,0 Гр також виходить на плато, що свідчить про пригнічення малими дозами ІВ здатності ЛПК онкологічних хворих до бластотрансформації.

Важливим висновком роботи є доказ кореляції зв'язку між інтенсивністю генерування САР та радіаційно-індукованою хромосомною нестабільністю ЛПК онкологічних хворих за дії малих доз опромінення, а саме, наявність плато на калібрувальних кривих в зазначеному дозовому діапазоні. Одержані результати є підґрунтям до подальшого вивчення особливостей дії малих доз ІВ на ЛПК хворих онкологічного профілю за умов радіомодифікації з метою захисту здорових клітин від променевого ускладнень.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьована тест-система лімфоцитів периферичної крові людини відповідно до стандартного міжнародного протоколу для виконання дослідження ефектів малих доз ІВ на біохімічні та цитогенетичні показники ЛПК хворих на РЕ.

2. До початку протипухлинної терапії інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикала (САР) лімфоцитами крові хворих на РЕ перевищує значення цього показника в 1,5 разу здорового контролю (781,6 імп./72с та 551,5 імп./72с, відповідно) та відповідає середній інтенсивності. Найбільше значення біохімічного показника САР відмічається при тестуючому опроміненні в дозі 0,1 Гр, що перевищує значення аналогічного показника лімфоцитів крові здорових донорів в 1,4 разу.

3. При дозі рентгенівського опромінення 0,1 Гр ЛПК хворих на РЕ співвідношення аберацій хроматидного та хромосомного типів склало 2,7 (9,2 / 100 метафаз та 3,4 / 100 метафаз, відповідно), відношення аберацій-обмінів до фрагментів при дозі опромінення – 1,2. Частота променевиx маркерів (дицентриків) у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр зростає приблизно у 25 разів, а парних фрагментів – у 4,4 разу. Частота дицентричних хромосом, починаючи з дози 0,5 Гр, перевищує 1, що дозволяє назвати їх дозозалежними показниками.

4. У діапазоні доз 0,1-1,0 Гр відмічається достовірне ($p \leq 0,05$) пригнічення мітотичної активності ЛПК хворих порівняно з неопроміненим контролем, що свідчить про негативний вплив опромінення в малих дозах (0,1-0,3 Гр) на проліферативний потенціал лімфоцитів.

5. Вперше встановлено, що аномальний характер дозових кривих для цитогенетичних показників співпадає з даними біохімічного фрагменту роботи, які також свідчать про наявність плато в цьому ж діапазоні доз. При тестуючому опроміненні ЛПК хворих в діапазоні доз 0,1–1,0 Гр для всіх

цитогенетичних показників (окрім аберацій хроматидного типу), в першу чергу для дицентриків, на кривій «доза-ефект» в інтервалі малих доз (0,1-0,5 Гр) реєструється плато, тобто дозозалежна ділянка (крива «доза-ефект» для біохімічного показника виходить на плато в діапазоні доз 0,3-0,5 Гр). Дозова крива мітотичної активності ЛПК з підвищенням дози опромінення до 1,0 Гр також виходить на плато, що свідчить про пригнічення малими дозами ІВ здатності лімфоцитів крові онкологічних хворих до бласттрансформації.

6. Важливим висновком роботи є доказ кореляції зв'язку між інтенсивністю генерування САР та радіаційно-індукованою хромосомною нестабільністю ЛПК онкологічних хворих за дії малих доз опромінення, а саме, наявність плато на калібрувальних кривих в зазначеному дозовому діапазоні.

7. Одержані результати є підґрунтям до подальшого вивчення особливості дії малих доз ІВ на ЛПК онкологічних хворих за умов радіомодифікації з метою захисту здорових клітин від променевого ускладнень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дёмина Э.А. Радиогенный рак:эпидемиология и первичная профилактика. К.: Наукова думка – 2016. – 198с
2. Рак в Україні, 2017-2018 «Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень Національного канцер – реєстру України № 20, Київ - 2019. 102с
3. Domina E.,Philchenkov A., Individual response to ionizing radiation and personalized radiotherapy. Critical review in oncogenesis. USA. – 2018- v.23(1-2). - p. 69-92
4. Дёмина Э.А. Хромосомные аномалии в лимфоцитах крови первичных онкологических больных в послечернобыльском периоде Scientific journal «ScienceRise : Biological Science» 2016 №1 , p. 20-25.
5. Дьоміна Е.А. Залежність доза – ефект в радіаційній цитогенетиці людини – Пробри радіаційної медицини та радіобіології 2019 Вип. 24, 235-249с.
6. Дьоміна Е.А. Залежність доза – ефект в радіаційній цитогенетиці людини – Пробри радіаційної медицини та радіобіології 2019 Вип. 24, 235-249с.
7. Спитковский Д.М Кнцепция действия малых доз ионизирующих излучений на клетки и ее возможные приложения к трактовке медико-биологических последствий // радиобиология . – 1992. – Т.32, №3. – С. 383 – 400
8. Готлиб В.Я., Пелевина И.И., Конопля Е.Ф., и др.. Некоторые аспекты биологического действия малых доз радиации // Радиобиология. – 1991.- Т.31, №3. – С. 318 – 325
9. ICRU, Report 36.Microdosimetry. – Maryland: Int. Comis. on Radiat. Units and Measure , 1983 . 1-2 с
10. Иванкова В.С., Дёмина Э.А. Проблемы резистентности опухолей в радиационной онкологии.-Киев: Здоров'я, 2012.- 192 с.
11. Мініч А. Вплив малих доз радіації на клітинний імунітет/ Реферат – 2010
[URL:https://perviydoc.ru/v20761/реферат](https://perviydoc.ru/v20761/реферат)

12. Міністерство охорони здоров'я, Наказ "Про затвердження державних санітарних правил "Основні санітарні правила забезпечення радіаційної безпеки України" від 02.02.2005 N 54

URL: http://search.ligazakon.ua/l_doc2.nsf/link1/TM025418.html

13. Д.М. Гродзинський Радіобіологія . Видавництво «Либідь», 2001

14. Макконки Э. Геном человека: Пер. с англ.-М.: Техносфера, 2008.- 288 с.

15. Эпигенетика: Пер. с англ. / Ред. С.Д. Эллис, Т. Дженювейн, Д. Рейн-берг. — М.: Техносфера, 2013.-496 с.

16. Дёмина Э.А., Бариляк И.Р. Генетические основы рака // Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. — 2009. —Вип. 1—2 (88—89). — С. 63—73.

17. Дружина М.О., Дьоміна Е.А., Липська А.І. Радіаційний канцерогенез // Онкологія: Лекції / Ред. В.Ф. Чехун.-К.: Здоров'я України, 2010.-С. 53—66

18. Дёмина Э.А. Радиогенный рак:эпидемиология и первичная профилактика. К.: Наукова думка – 2016 – 59с.

19. Tanooka H., Ootsuyata A. Non-linear threshold dose response tumorigenesis by repeated B-irradiation and p53 mutations involved // Proc. 10h Int. Congr. Radiat. Res.-Warsburg.-1995.-Vol. 1.-P. 96.

20. Хансон Л.П., Евтушенко В.И. Клеточные и молекулярные механизмы радиационного канцерогенеза // Вопр. онкологии.-2006.- 52, N 1.- С. 3—11.

21. Гофман Дж. Чернобыльская авария: радиационные последствия для настоящего и будущего поколений.- Минск: Вышэйш. шк., 1994.-570

22. United Nation Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly with Scientific Annexes /// Sources and effects of ionizing radiation.-New York, 2000. - Vol. 2: Effects Annex G: Biological effects at low radiation doses. -P. 75—144

23. Kirsch I.R., Abdallan J.M., Beriness V.L. et al. Lymphocytespecific genetic instability and cancer // Cold. Spring Harbor Symposia on Quantitative an Biology. - 1994.-59.-P. 287—295

24. Стрельцова В.Н., Москалев Ю.И. Отдаленные последствия радиационного поражения. Бластомогенное действие.-М.: ВИНТИ, 1985- Т. 5.-181 с.

25. Севаньяев А.В., Шаврова Т.Г., Потетня О.И. и др. Сравнительное исследование структурных и генных соматических мутаций у работников ядерно-химических предприятий. 1. Исследование нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций // Радиационная биология. Радиационная экология. - 2005. - 45, No 2. - С. 149—161
26. Дружина М.О., Дьоміна Е.А., Липська А.І. Радіаційний канцерогенез // Онкологія: Лекції / Ред. В.Ф. Чехун.-К.: Здоров'я України, 2010.-С. 53—66
27. Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н., Шагирова Ж.М., Шуленина Л.В. Исследование мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухолей как подход к изысканию способов индивидуального прогноза отдаленных последствий облучения // Радиационная биология. Радиационная экология.-2010. -50, No 2.- С. 134— 141
28. Spandidos D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis // BUON. 2007.-12, suppl. 1.- P. 9-12.
29. Погрібний І.П., Шпильова С.І., Чехун В.Ф. Роль епігенетичних процесів в нормі та розвитку пухлинної хвороби // Онкологія: Лекції / Ред. В.Ф. Чехун. — К.: Здоров'я України, 2010.-С. 152—165.
30. Renton A., Llanos S., Lu X. Hypoxia induced p53 through a pathway distinct from DNA-damaging and stress-inducing agents /// Carcinogenesis.— 2003. - 24, N 7. — P. 1177—1182
31. Linke S.P., Clarkin K.C., Di Leonardo A. et al. A reversible p53 dependent G/G cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage // Genes. Devel. -1996.-10.-P. 934-947.
32. Pfeifer G.P., Holmquist G.P. Mutagenesis of the p53 gene // Biochem. et biophys. acta. -1997.-1333, N 1. -P. M1-M8.
33. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway /// Annu. Rev. Biochem.- 2010. — 79, N 1. P. 181—211.
34. Бурлакова Е.Б., Михайлов Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза в радиационно-индуцированной нестабильности // Радиационная биология. Радиационная экология.-2001.-41, No 5. — С. 489—499.

35. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. -К.: Либідь, 2000.-448 с.
36. Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н., Шагирова Ж.М., Шуленина Л.В. Исследование мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухолей как подход к изысканию способов индивидуального прогноза отдаленных последствий облучения // Радиационная биология. Радиационная экология.-2010. -50, No 2.- С. 134—141
37. Смирнова С.А., Смирнов А.С., Смирнов Ю.С. Ответственность репарации и апоптоза за эффективность малых доз: результаты теоретического математического моделирования // Материалы VI съезда по радиационным исследованиям (Москва, 25—28 окт. 2010 г.). -М., 2010. -2.-С. 154.
38. Tsai A.G., Lieber M.R. Mechanisms of chromosomal rearrangement in human genome // BMC Genomics.-2010.-11, suppl. 1.-S. 1. 71.
39. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. — М.: Высш. шк., 2004.-549 с.
40. Обатуров Г.М., Филимонов А.С. Роль двунитевых разрывов ДНК в процессах радиационного структурного мутагенеза в эукариотических клетках // Радиационная биология. Радиационная экология. -1993.-33, N 2 (5). — С. 717—723.
41. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway // Annu. Rev. Biochem.- 2010. — 79, N 1. P. 181—211.
42. Газиев А.И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации // Радиационная биология. Радиационная экология.-2011.-51, N 5.-С. 512—529.
43. Falt S. Long-term global gene expression patterns in irradiated human Tymphocytes // Carcinogenesis. -2003.-24, N11.-P. 1837--1845.
44. Mothersill C., Seymour C. Radiation-induced Bystander effect: past history and future directions // Radiat. Res. -2001.-155, N 6. P. 757—765.
45. Prise K.M., Belyakov O.V., Newman H.C. et al. Non targeted effects of radiation: Bystander response in cell and model // Radiat. Prot. Dosim. - 2002. — 99, N 1—4. P. 223—226.

46. Lorimore S.A., Coates P.J., Wright E.G. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation // *Oncogene*. - 2003.- 22, N 45. — P. 7058—7069
47. Mothersill C., Seymour C. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an «out of field» perspective // *Mutat. Res.*- 2006. -597.-P. 5—10.
48. Аклеев А.В., Овчарова Е.А. Иммунный статус людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки // *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2007
49. Гриневич Ю.А. Основные принципы использования иммунотерапии при лечении больных со злокачественными новообразованиями // *Онкология*.— 2001.-3, N 2-3.-С. 216—222.
50. Brenner D.J., Curtis R.E., Hall E.J., Ron E. Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery // *Cancer*.- 2000. - 88. -P. 389—406. 2007. - No 3.-С. 5—9.
51. Darby S.C., Mc Gale P., Tayler C.H., Peto R. Long-term mortality from heart disease and lung cancer after radiotherapy for early breast cancer: prospective cohort study of about 300 000 women in US SEER cancer registries // *Lancet Oncol.*- 2005. -6.-P. 557—565.
52. Джойнер М.С., Когель О.Д. Основы клинической радиобиологии: Пер. с англ. -М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. -600с.
53. Suit H., Goldberg S., Niemierko A. et al. Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of date on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects // *Radiat. Res.*-2007.- 167, N 1.- P. 12-42.
54. Поняття радіочутливості живих організмів. Реферат 2011 4-5с
URL: <https://osvita.ua/vnz/reports/ecology/18848/>
55. Andreassen C.M., Alsner J., Overgaard M., Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes // *Radiat. Oncol.* - 2003.-Vol. 69.-No 2.-P. 127-135.
56. Streffer C. Genetische predisposition und strahlen empfindlichkeit bei normalen gewebe // *Strahlenther. Onkol.* 1997.-Vol. 173. P. 462-468.

57. Fearon E.R. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer // *Science*.-1997.-V. 278.-P. 1043-1050.
58. Darroudi F., Vyas R.C., Vermeulen S., Natarajan A.T. G2 radiosensitivity of cells derived from cancer-prone individuals // *Mutat. Res.*-1995.-Vol. 328.- P. 83-90.
59. P.E. Bryant. DNA damage, repair and chromosomal damage // *Int. J. Radiat. Biol.*- 1997.-Vol. 71/-P.675-680.
60. Turesson I, Carlsson J, Brahme A., Glimenlius B., Zackrisson B., Stenerlow B. Biological response to radiation therapy // *Acta Oncol*/- 2003.-Vol. 42. -No 2.- P. 92-106.
61. Rosen E.M., Fan S., Rockwell S., Goldberg I.D. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: Implications for understanding how normal tissue and tumors respond to therapeutic radiation // *Cancer Invest.*- 1999. -Vol 17.-No 1.-P. 56-72.
62. Hagmar L., Brogger A., Hansteen J., Heim S. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes // *Radiat. Res.*-1998.-V. 54.-P. 2919-2922.
63. Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Huici Montagud A., Tinnerberg H., Forni A., Heikkila P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I-L., Krudsen L., Norppa H. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict cancer independently of exposure to carcinogens *Cancer Research*. - 2000. -Vol. 60.- P.1619-1625.
64. Norppa H. Cytogenetic biomarkers. In: Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of cancer // *IARC Science Publication*.- 2004.-Vol. 157.- P. 179-205.
65. Radford I.R. Chromosomal rearrangement as the basis for human tumorigenesis // *Int.J. Radiat. Res.*-2004.-Vol. 80.-No 8.-P. 543-557.
66. Дружина М.О., Маковецька Л.І., Дьоміна Е.А. Інтенсивність генерування супероксидного аніон – радикала лімфоцитами крові донорів як пре диктор їх радіочутливості . «Актуальні питання радіаційної онкології в Україні» 2020
67. Hongkun Wang , Ying Wang , Krishna K Kota , Bing Sun , Bhaskar Kallakury , Nabil N Mikhail , Douaa Sayed , Ahmed Mokhtar , Doaa Maximous , Etemad H

Yassin , Scarlett X Sun , Xiaofei Chen, Christopher A Loffredo , Yun-Ling Zheng
Strong associations between chromosomal aberrations in blood lymphocytes and
the risk of urothelial and squamous cell carcinoma of the bladder.2017

68. Dimitry A. Chistiakov, Natalia V. Voronova & Pavel A. Chistiakov Received
Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and
susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. 2007

69. Бучинська Л.Г., Брєєва О.В., Несіна І.П., Глущенко Н.М., Турчак О.В.,
Юрченко Н.П. Особливості репарації ДНК у лімфоцитах периферичної крові
та пухлинній тканині хворих на рак ендометрію. 2016

70. Дьоміна Е.А., Іванкова В.С., Главін О.А., Дружина М.О.,
Михайленко В.М., Маковецька Л.І., Грінченко О.О., Хруленко Т.В.,
Барановська Л.М. Комплексне дослідження радіочутливості крові первинних
хворих на рак ендометрію. «Актуальні питання радіаційної онкології в
Україні» 2020

71. Главін О.А., Дьоміна Е.А., Михайленко В.М., Маковецька Л.І.
Визначення кореляційних зв'язків між станом про- та антиоксидантних
процесів в крові хворих на рак передміхурової залози та хромосомною
нестабільністю лімфоцитів. 2019

72. Смоланка І.І., Михайленко В.М., Дружина М.О. Вільнорадикальні
процеси в периферичній крові хворих із передпухлинною патологією
молочної залози. 2018

73. Уманский Ю. А., Пинчук В. Г. Лимфоциты и опухолевый рост. К.: Наук.
думка, 1982. -254 с.

74. Досенко В.Є Т-лімфоцити . Інтерв'ю вчених НАН України – 2020

75. Лежава Е. А., Хмаладзе Е. В. Спонтанный уровень количествен-
но-структурных изменений хромосом в старческом возрасте // Изв. АН Груз.
ССР. Сер. Биология.-1978.-Т. 4, № 2. С. 162-170.

76. Чеботарев А. Н. Закономерности хромосомной изменчивости
соматических клеток человека / Вестн. РАМН. № 10. С. 64-69.
134.Руководство по изучению генетических эффектов в популяциях
человека. Женева: ВОЗ, 1989.

77. Севаньяев А. В. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека
в митотическом цикле.-М.: Энергоатомиздат, 1987. 160 с.

78. Schmid E., Vaichinger M., Vinde E. et al. Comparison of the chromosome damage and its dose response after medical whole-body exposure to "C-rays and irradiation of blood in vitro // Int. J. Radiat. Biol. -1974. 26, 1.- P. 31-37. 2001. Вып. 46. 122 с.
79. Э.А. Дёмина, М.А. Пилинская, Ю.И. Петунин, Д.А. Ключин Радиационная цитогенетика. Київ «Здоров'я» - 2009
80. Дружина М.О., Дьоміна Е.А., Маковецька Л.І. Метаболіти оксидативного стресу як предиктори променевиx та канцерогенних ризиків. 2019
81. Дьоміна Е.А. Залежність доза – ефект в радіаційній цитогенетиці людини – Проби радіаційної медицини та радіобіології 2019 Вип. 24, 235-249с.
82. Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М. Оцінка індивідуальної радіочутливості умовно здорових осіб на основі розробленої схеми цитогенетичного обстеження // Лаб. діагностика. 2006.-№ 2 (36). — С.30-34.
83. Издательство ЛЭТИ. Малый практикум по цитогенетике: изучениекариотипа человека. 2018, р. 426.
84. Дружина М.О., Маковецька Л.І., Дьоміна Е.А. Інтенсивність генерування супероксидного аніон – радикала лімфоцитами крові донорів як пре диктор їх радіочутливості . «Актуальні питання радіаційної онкології в Україні» 2020
85. Смоланка І.І., Михайленко В.М., Дружина М.О.Вільнорадикальні процеси в периферичній крові хворих із передпухлинною патологією молочної залози. 2018
86. Р.Ф., Єрьоменко, Е.В., Супрун М.Б. Ш та інші. Методи лабораторної діагностики спадкових захворювань. 2017, р. 246.
87. Рак в Україні, 2017-2018 «Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень Національного канцер – реєстру України № 20, Київ - 2019. 102с
88. Дёмина Э.А., Бариляк И.Р. Генетические основы рака // Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. — 2009. —Вип. 1—2 (88—89). — С. 63—73.
89. Дьоміна ЕА., Дружина М.О., Рябченко Н.М. індивідуальна радіочутливість людини.-К.: Логос, 2006.- 126 с.

90. Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Горбунов и др. Последствия Чернобыльской катастрофы: здоровье человека / Ред. Е.Б. Бурлакова.-М.: Науч. совет по радиобиологии РАН, 1996. - 220 с.
91. Маленченко А.Ф., Сушко С.Н., Кузьмина Т.С. Влияние мощности дозы на индукцию хромосомных aberrаций и опухолей легких у мышей при сочетанном действии ионизирующего излучения и химических веществ // Радиационная биология. Радиозэкология.-1995.-35, No 5. -С. 777—784.
92. Демина Э.А. Хромосомные аномалии в лимфоцитах крови первичных онкологических больных в послечернобыльском периоде Scientific journal «ScienceRise : Biological Science» 2016 №1 , p. 20-25.
93. Носик О.В Автореферат Оптимізація медичного опромінення пацієнтів в проекційній рентгенодіагностиці. Київ – 2021.
94. Горневич Ю.А., Демина Э.А. Иммунологические и цитогенетические эффекты высоко- и редкоионизирующих излучений Киев :«Здоров'я», 2006 – 200 с.
95. Фролов А. К., Арцимович Н. Г., Сохин А. А. Иммуноцитогенетика. 1993, p. 240.
96. Пяткин Е.К., Нугис В.Ю., Покровская В.Н. и частота aberrаций хромосом в первом митозе облученных лимфоцитов и в культурах облученных клеток. Радиационная биология. Радиозэкология 1984 - Т.24, вып.3. – с.310-314