

ВИКОРИСТАННЯ ДОДАТКОВОГО МУТАГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ БЛЕОМІЦИНОМ *IN VITRO* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

С. С. Дибський

Науковий Центр радіаційної медицини АМН України (Київ)

Вступ

У віддалені строки після Чорнобильської аварії провідне значення для реалізації стохастичних і деяких нестохастичних медичних наслідків променевого ураження людини має радіаційно-індукована нестабільність геному [1, 2]. На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному відіграє прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи аберантному каріотипі, яка проявляється як підвищення чутливості хромосом соматичних клітин людини до дії інших мутагенів - *in vivo* та *in vitro*.

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності використовуються т.з. "мутагени-провокатори" - в основному, іонізуюче випромінювання та радіоміетик блеоміцин, якими обробляється культура лімфоцитів периферичної крові людини на ранній чи пізній постсинтетичній стадії мітотичного циклу (G_2 -sensitivity assay) [3-5]. При порівнянні чутливості хромосом лімфобластоїдних клітин, одержаних від онкологічних пацієнтів та контрольних донорів, до мутагенної дії іонізуючого випромінювання та блеоміцину, виявлена позитивна кореляція між цитогенетичними ефектами, індукованими обома мутагенами-провокаторами, на основі чого рекомендовано використовувати блеоміцин як альтернативу опроміненню [5].

Тести визначення індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії опромінення чи блеоміцину одержали найбільше поширення при обстеженні онкологічних пацієнтів.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

переважно, для виявлення гіперчутливих осіб, схильних до виникнення та розвитку злоякісних новоутворень різної локалізації [6, 7]. При обстеженні Чорнобильських контингентів перевірялась чутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові опромінених осіб до дії гамма-радіації та модельного мутагену діматифу на G_1 стадії мітотичного циклу [8]. В результаті проведених досліджень встановлено як реальність радіоіндукованої зміни стабільності геному соматичних клітин людини, так і необхідність подальшого удосконалення і стандартизації моделі для її виявлення.

Враховуючи масштабність медичних наслідків Чорнобильської катастрофи (включаючи онкопатологію) та беручи до уваги попередні наукові доробки, метою нашого дослідження було визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини.

Оскільки на сьогодні не існує уніфікованої тест-системи для оцінки індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії блеоміцину, різні дослідники використовують блеоміцин як мутаген-провокатор в широкому діапазоні концентрацій, що утруднює порівняння одержаних результатів.

Метою роботи було відпрацювати модельну тест-систему для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові та випробувати її на групі практично здорових мешканців м.Києва.

Матеріал і методи дослідження

Для цитогенетичного аналізу цільну кров (5 мл від кожної особи) культивували за напівмікретодом у нашій модифікації. Культуру лімфоцитів інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном (Sigma, USA) без ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, з фітогемаглютиніном (PHA, Discop, USA) впродовж 54 год (решту 2 год - з колцемідом, Colcemid, Sigma, USA), що дозволяло аналізувати клітини переважно першого культурального мітозу. Після гіпотонічної обробки (0,075 молярним розчином KCl) і фіксації (абсолютним етанолом та льодяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3:1) одержували фіксовані клітинні осадки, які зберігали у морозильній камері

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

при температурі мінус 20°C до моменту приготування препаратів метафазних хромосом.

При постановці експериментів використовували гідрохлорид блеоміцину для ін'єкцій (Bleocin, BLM, Nirron Kayaku Co. LTD). Базовий розчин та необхідні розведення готували за допомогою стерильного 0,9 % розчину хлористого натрію. Блеоміцин додавали до культури лімфоцитів через 48 годин після початку інкубації, тобто обробляли культуру *in vitro* на пізній постсинтетичній (G_2) стадії мітотичного циклу.

Цитогенетичний аналіз проводили "всліпу", на рівномірно пофарбованих зашифрованих препаратах метафазних хромосом під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Кількість проаналізованих метафаз для кожного з варіантів залежала від мітотичного індексу культури і коливалась від 50 до 500, складаючи в середньому 200 на варіант, що відповідало вимогам необхідним для дослідження цитогенетичного ефекту хімічних сполук в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* [9]. Всього проаналізували 8875 метафаз. Для оцінки стабільності хромосомного апарату враховували всі аберації хроматидного та хромосомного типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом [9].

Отримані результати та їх обговорення

При відпрацюванні моделі для дослідження прихованої хромосомної нестабільності нами було апробовано цитогенетичну дію 4-х найчастіше застосовуваних концентрацій блеоміцину (0,05; 5,00; 50,00; 500,00 мкг/мл) в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від 7-ми умовно здорових донорів (всі чоловіки) середнього віку. Кожну концентрацію тестували у двох-трьох повтореннях. Результати тестування цитогенетичної активності різних концентрацій блеоміцину *in vitro* наведені в табл. 1.

Як видно з наведених в табл. 1 даних, при дії блеоміцину *in vitro* спостерігали дозозалежний цитогенетичний ефект - частоти аберантних метафаз та хромосомних аберацій зростали із підвищенням концентрації препарату і коливались від 4,5 до

48,0% та від 5,5 до 150,0 на 100 метафаз (при мінімальній та максимальній концентрації блеоміцину, відповідно), що достовірно ($p < 0,01$) перевищувало аналогічні контрольні показники (1,12 % та 1,23 на 100 метафаз, відповідно) (табл.1).

Таблиця 1

Цитогенетичний ефект блеоміцину в культурі лімфоцитів периферичної крові різних донорів *in vitro*

Концентрація блеоміцину, мкг/мл	Аберантні клітини, %		Хромосомні аберації, на 100 клітин		Хроматидного типу (на 100 клітин)			Хромосомного типу (на 100 клітин)					
					одиночні фрагменти	обміни	сума	парні фрагменти	дисцентрики	центричні кільця	аномальні моноцентрики	ацентричні кільця	сума
	M	m	M	m									
0	1,12	0,19	1,23	0,20	0,58	0,00	0,58	0,39	0,11	0,00	0,11	0,03	0,64
0,05	4,50	1,47	5,50	1,61	1,50	0,50	2,00	3,00	0,50	0,00	0,00	0,00	3,50
5,00	14,50	2,49	35,00	3,37	28,00	0,00	28,00	6,50	0,50	0,00	0,00	0,00	7,00
5,00	17,50	2,69	36,68	3,41	18,60	0,00	18,60	16,90	0,59	0,00	0,00	0,59	18,08
5,00	15,50	2,56	38,00	3,43	20,50	0,00	20,50	17,00	0,50	0,00	0,00	0,00	17,50
50,00	25,00	3,06	67,14	3,32	60,71	0,00	60,71	5,00	1,43	0,00	0,00	0,00	6,43
50,00	30,40	3,25	95,60	1,45	84,30	0,00	84,30	11,30	0,00	0,00	0,00	0,00	11,30
50,00	24,00	3,02	60,00	3,46	23,50	0,00	23,50	35,00	1,00	0,00	0,50	0,00	36,50
500,00	48,00	5,77	128,0		74,70	0,00	74,70	53,30	0,00	0,00	0,00	0,00	53,30
500,00	42,00	6,98	150,0		124,0	0,00	124,0	26,00	0,00	0,00	0,00	0,00	26,00

При всіх досліджених концентраціях блеоміцину (навіть при мінімальній - 0,05 мкг/мл) кількість аберацій перевищувала кількість аберантних метафаз (тобто частина аберантних клітин містила більше однієї аберації), і при максимальній концентрації (500 мкг/мл) на одну аберантну клітину в середньому припадало 3,61 хромосомних уражень. При концентраціях 50 та 500 мкг/мл спостерігали не тільки потужний цитогенетичний ефект (аж до фрагментації та пульверизації хромосомного матеріалу), але й виражену цитотоксичну дію - прогресуюче зниження мітотичної активності, що значно утруднювало проведення хромосомного аналізу таких препаратів на матеріалі, отриманом від донорів.

Пошкодження хромосом були представлені переважно простими абераціями - парними та одиночними ацентричними фрагментами з домінуванням останніх, що характерно для кластогенної дії блеоміцину *in vitro*. Частоти обмінних аберацій не залежали від концентрації препарату і, за винятком дицентриків, знаходились в межах спонтанних коливань.

При порівнянні цитогенетичного ефекту, індукованого блеоміцином в однакових дозах в культурах, одержаних від різних донорів, видно, що за інтегральними цитогенетичними показниками (частоти абераційних клітин та всіх типів аберацій) група була досить гомогенна - донори майже не відрізнялись, але за окремими типами аберацій (співвідношення між одиночними та парними ацентричними фрагментами) спостерігались певні міжіндивідуальні коливання.

За результатами тестування цитогенетичної активності блеоміцину в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* для подальших досліджень було відібрано дві оптимальні концентрації препарату - 0,05 та 5,00 мкг/мл, при яких майже не пригнічувалась мітотична активність культури та спостерігалось достовірне зростання частоти хромосомних аберацій без пульверизації хромосомного матеріалу. Оскільки навіть при цих концентраціях підвищувалась "завантаженість" абераційних метафаз хромосомними пошкодженнями (з'являлись мультиабераційні клітини), саме частоту аберацій хромосом (а не абераційних метафаз) доцільно вважати основним критерієм чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином.

На відпрацьованій моделі проведено дослідження стабільності хромосом лімфоцитів в контрольній групі - у 9-ти умовно здорових донорів (3-х жінок, 6-ти чоловіків у віці 18-64 роки), які заперечували свідомий контакт з відомими чи потенційними мутагенами.

Індивідуальні фонові (вихідні) частоти цитогенетичних показників в групі порівняння (без додавання до культури лімфоцитів обстежених донорів блеоміцину) наведені в таблиці 2.

Таблиця 2
Результати цитогенетичного обстеження осіб з групи порівняння (без додавання блеоміцину)

№	Абераційні клітини, %		Хромосомні аберації, на 100 клітин		Хроматидного типу, на 100 клітин			Хромосомного типу, на 100 клітин					
	M	m	M	m	одиночні фрагменти	обміни	сума	парні фрагменти	дицентрики	центричні кільця	аномальні моноцентрики	ацентричні кільця	сума
1	1,00	0,50	1,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,25	0,50
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	1,00	0,50	1,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50
4	2,00	0,81	2,00	0,81	1,50	0,00	1,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
5	1,25	0,56	1,25	0,56	0,25	0,00	0,25	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
6	1,80	0,59	1,80	0,59	1,00	0,00	1,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80
7	2,00	0,99	3,00	1,21	1,50	0,00	1,50	0,50	0,50	0,00	0,50	0,00	1,50
8	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50
9	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
M	1,12		1,23		0,58	0,00	0,58	0,39	0,11	0,00	0,11	0,03	0,64
m	0,19		0,20		0,14	0,00	0,14	0,11	0,06	0,00	0,06	0,03	0,15

Як видно з даних, наведених в табл. 2, середньогрупова частота абераційних клітин складала $1,12 \pm 0,19$ % з міжіндивідуальними коливаннями від 0 до 2,00 %, що не відрізнялося від середньопопуляційного рівня (1,50 %), який варіює в межах від 1,00 до 3,00 % ($p > 0,01$) [31]. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації - одиночні та вільні парні фрагменти, співвідношення між їх частотами наближалось до 1:1. Середньогрупові частоти обмінних аберацій - дицентриків, ацентричних кілець та атипичних моноцентриків, які зустрічались у окремих індивідів, також відповідали стандартним значенням популяційного контролю та складала $0,11 \pm 0,06$, $0,03 \pm 0,03$ та $0,11 \pm 0,06$ на 100 метафаз, відповідно.

Одержані результати показали однорідність обстеженої групи за фоновими цитогенетичними показниками та відповідність

частот хромосомних аберацій середньопопуляційним даним, які характерні для спонтанного хромосомного мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини.

Результати цитогенетичного обстеження осіб з групи порівняння при тестуючому мутагенному навантаженні блеоміцином *in vitro* в концентрації 0,05 мкг/мл наведені в табл. 3 (середньогрупові дані) та 4 (індивідуальні дані).

Таблиця 3
Порівняння середньогрупового цитогенетичного ефекту в інтактних (І) та експонованих (Б) культурах після тестуючої мутагенної дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл

Типи аберацій	Частота аберацій (на 100 метафаз)	P
Хроматидні обміни (І) Хроматидні обміни (Б)	0,00±0,00 0,00±0,00	
Парні фрагменти (І) Парні фрагменти (Б)	0,39±0,11 4,07±0,42	p<0,01
Дигентрики (І) Дигентрики (Б)	0,11±0,06 0,17±0,09	p>0,05
Центричні кільця (І) Центричні кільця (Б)	0,00±0,00 0,00±0,00	
Аномальні моноцентрики (І) Аномальні моноцентрики (Б)	0,11±0,06 0,06±0,05	p>0,05
Ацентричні кільця (І) Ацентричні кільця (Б)	0,03±0,03 0,22±0,10	p<0,05
Всього аберацій (І) Всього аберацій (Б)	1,23±0,20 10,37±0,66	p<0,01
Розкид індивідуальних коливань	3,00—32,00	
Додаток до вихідної частоти	9,14	

Таблиця 4
Результати цитогенетичного обстеження осіб з групи порівняння при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro* в концентрації

№	Аберантні клітини, %		Хромосомні аберації, на 100 клітин		Хроматидного типу, на 100 клітин			Хромосомного типу, на 100 клітин					
	M	m	M	m	одиночні фрагменти	обміни	сума	парні фрагменти	дигентрики	центричні кільця	аномальні моноцентрики	ацентричні кільця	сума
1	5,50	1,61	8,00	1,92	2,00	0,00	2,00	5,00	0,50	0,00	0,50	0,00	6,00
2	4,00	1,39	8,00	1,92	6,00	0,00	6,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
3	6,50	1,74	32,00	3,30	20,00	0,00	20,00	10,50	0,50	0,00	0,00	1,00	12,00
4	7,00	1,28	9,00	1,43	4,50	0,00	4,50	4,00	0,00	0,00	0,00	0,50	4,50
5	5,34	1,30	9,00	1,65	5,00	0,00	5,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00
6	6,00	1,37	12,34	1,90	7,67	0,00	7,67	4,67	0,00	0,00	0,00	0,00	4,67
7	4,50	1,47	8,50	1,97	3,00	0,00	3,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,50	5,50
8	2,00	0,99	3,00	1,21	2,00	0,00	2,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00
9	2,00	0,99	3,50	1,30	2,50	0,00	2,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
M	4,76		10,37		5,85	0,00	5,85	4,07	0,17	0,00	0,06	0,22	4,52
m	0,45		0,65		0,50	0,00	0,50	0,42	0,09	0,00	0,05	0,10	0,44

Як видно з даних, наведених в табл. 3 та 4, після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота аберантних метафаз зросла до 4,76±0,45 %, а частота аберацій хромосом - до 10,37±0,66 на 100 метафаз, що достовірно (p<0,01) відрізнялось від такої в інтактних культурах (1,12±0,19 % та 1,23±0,20 на 100 метафаз, відповідно). Середня частота аберацій на одну аберантну клітину досягала 2,18. Додаток до фонові середньогрупової частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) складав 9,14 на 100 метафаз.

Серед пошкоджень хромосом знов-таки значно домінували прості аберації (одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні, близькому до 1:1) - як у окремих осіб, так і по групі в середньому, що характерно для кластогенної дії блеоміцину.

За всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою переважно фрагментацією хромосом, спостерігали певну міжіндивідуальну варіабільність, яка не залежала від величини фондових даних, одержаних в інтактних культурах.

Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій складав 3,00-32,00 на 100 метафаз. Серед групи порівняння виділявся донор № 3 з максимальним цитогенетичним ефектом (32,00 аберацій на 100 метафаз) та максимальною "завантаженістю" абераційних клітин пошкодженнями хромосом (4,92 на одну абераційну метафазу), хоча фонові частота хромосомних аберацій у нього складала лише 1,00 на 100 метафаз.

Таким чином, використання блеоміцину як мутагена-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати одну особу з неадекватно підвищеною чутливістю до мутагенної дії, що, виходячи з анамнезу, може бути генетично зумовленим феноменом.

Результати цитогенетичного обстеження осіб з групи порівняння при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro* в концентрації 5,0 мкг/мл наведені в табл. 5 (середньогрупові дані) та 6 (індивідуальні дані).

Як видно з даних, наведених в табл. 5 та 6, при дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл зросли як індивідуальні частоти абераційних метафаз та хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до $8,63 \pm 0,61$ % та $15,54 \pm 0,78$ на 100 метафаз, відповідно), але середня кількість аберацій в одній абераційній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і складала 1,80, що може бути зумовлено цитотоксичною дією препарату. Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також достовірно підвищилась по групі в середньому становила 14,31 на 100 метафаз.

Основним типом хромосомних пошкоджень, індукованих блеоміцином, залишились прості аберації - одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні близькому до 1:1, але у деяких осіб з'явилися асиметричні хромосомні обміни (дисцентричні та кільцеві хромосоми), завдяки чому дещо зросла їх середньогрупова частота (до $0,56 \pm 0,15$ на 100 клітин).

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Таблиця 5

Порівняння середньогрупового цитогенетичного ефекту в інтактних (І) та експонованих (Б) культурах після тестуючої мутагенної дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл

Типи аберацій	Частота аберацій (на 100 клітин)	P
Одиночні фрагменти (І)	$0,58 \pm 0,14$	p<0,01
Одиночні фрагменти (Б)	$8,67 \pm 0,61$	
Хроматидні обміни (І)	$0,00 \pm 0,00$	
Хроматидні обміни (Б)	$0,00 \pm 0,00$	
Парні фрагменти (І)	$0,39 \pm 0,11$	p<0,01
Парні фрагменти (Б)	$6,04 \pm 0,51$	
Дицентрики (І)	$0,11 \pm 0,06$	p<0,05
Дицентрики (Б)	$0,39 \pm 0,13$	
Центричні кільця (І)	$0,00 \pm 0,00$	p<0,05
Центричні кільця (Б)	$0,17 \pm 0,09$	
Аномальні моноцентрики (І)	$0,11 \pm 0,06$	p>0,05
Аномальні моноцентрики (Б)	$0,22 \pm 0,10$	
Ацентричні кільця (І)	$0,03 \pm 0,03$	p>0,05
Ацентричні кільця (Б)	$0,06 \pm 0,05$	
Всього аберацій (І)	$1,23 \pm 0,20$	p<0,01
Всього аберацій (Б)	$15,54 \pm 0,78$	
Розкид індивідуальних коливань	5,00—35,00	
Додаток до вихідної частоти	14,31	

Реакція хромосомного апарату на дію мутагена-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл суттєво відрізнялась у різних осіб. Окрім гіперчутливого індивіда № 3 (виявленого при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином в концентрації 0,05 мкг/мл), при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл ідентифіковано ще двох осіб із прихованою хромосомною нестабільністю - №№ 5 та 7. Частота хромосомних аберацій у цих індивідів становила $35,0 \pm 3,37$; $16,00 \pm 2,32$; $34,00 \pm 3,35$ на 100 метафаз, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 5,00 до 12,00 на 100 метафаз.

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

Таблиця 6
Результати цитогенетичного обстеження осіб з групи порівняння при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro* в концентрації 5,00 мкг/мл

№	Аберантні клітини, %		Хромосомні аберації, на 100 клітин		Хроматидного типу, на 100 клітин			Хромосомного типу, на 100 клітин					
	M	m	M	m	одиночні фрагменти	обміни	сума	парні фрагменти	дигентрики	центричні кільця	аномальні моноцентрики	ацентричні кільця	сума
1	6,50	1,74	10,00	2,12	5,50	0,00	5,50	4,00	0,00	0,50	0,00	0,00	4,50
2	6,50	1,74	13,00	2,38	8,00	0,00	8,00	4,50	0,50	0,00	0,00	0,00	5,00
3	19,50	2,80	35,00	3,37	17,00	0,00	17,00	15,50	1,00	0,50	1,00	0,00	18,00
4	8,00	1,36	12,00	1,62	6,00	0,00	6,00	5,00	0,00	0,50	0,50	0,00	6,00
5	7,20	1,63	16,00	2,32	12,00	0,00	12,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00
6	6,50	1,74	9,50	2,07	7,00	0,00	7,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50
7	15,50	2,56	34,00	3,35	16,50	0,00	16,50	15,50	1,50	0,00	0,00	0,50	17,50
8	4,00	1,39	5,00	1,54	2,00	0,00	2,00	2,00	0,50	0,00	0,50	0,00	3,00
9	4,00	1,13	5,33	1,30	4,00	0,00	4,00	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33
M	8,63		15,54		8,67	0,00	8,67	6,04	0,39	0,17	0,22	0,06	6,87
m	0,61		0,78		0,61	0,00	0,61	0,51	0,13	0,09	0,10	0,05	0,55

Висновки

З використанням модифікованого тесту "G2-bleomycin sensitivity assay" в контрольній групі донорів виявлено трьох осіб, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора, що, виходячи з їх анамнезу (відсутність контакту із відомими чи потенційними мутагенами), можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

Література

1. Мазурик В.К. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение / В.К.Мазурик, В.Ф.Михайлов // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т. 41, № 35. - С. 272-289.
2. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response / L.Smith, S.Nagar, G.Kim, W. Morgan // Health Physics. - 2003. - Vol. 85, № 1. - P. 23-29.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

3. Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer / D.Scott // Cytogen. and Genome Res. - 2004. - Vol. 104, № 1-4. - P. 365-370.

4. Ryabchenko N. Radiosensitivity of human chromosomes estimated on the basis of the application of the test-system of peripheral blood lymphocytes / N.Ryabchenko, E.Dyomina // Chromosome Res. - 2005. - Vol. 13, Suppl. 1. - P. 3567.

5. Comparison of bleomycin and radiation in G2 assay of chromatid breaks / A. Adema, J. Closs, R. Verheijen [e.a.] // Int. J. Radiat. Biol. - 2003. - Vol. 79, № 8. - P. 655-661.

6. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? / G. Szekely, E. Remenar, M. Rifsler [e.a.] // Mutagenesis. - 2003. - Vol. 18, № 1. - P. 59-63.

7. Hsu T.C. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility / T.C.Hsu, M.K.Spitz, S.P. Schantz // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. - 2002. - Vol. 1. - P. 83-89.

8. Педан Л.Р. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* / Л.Р.Педан, М.А.Пілінська // Доповіді НАН України. - 2004. - № 12. - С. 175-179.

9. Хромосомы человека : атлас / А.Ф. Захаров, В.А. Беньюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. - М.: Медицина. - 1982. - 263 с.

Резюме

Дибський С.С. Використання додаткового мутагенного навантаження блеоміцином *in vitro* для визначення прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини.

Проведено опрацювання модельної системи для дослідження прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro*. Визначено оптимальні строки обробки культури лімфоцитів блеоміцином (пізня постсинтетична G2 стадія мітотичного циклу) та оптимальні концентрації препарату (0,05 та 5,00 мкг/мл), придатні для оцінки чутливості хромосом соматичних клітин людини *in vitro* до мутагенного навантаження. Встановлено, що основним критерієм чутливості хромосом до тестуючої мутагенної дії блеоміцину доцільно вважати загальну частоту аберацій хромосом, а не аберантних метафаз. На відпрацьованій моделі проведено дослідження прихованої хромосомної нестабільності у

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

9-ти осіб з контрольної групи. Виявлено трьох індивідів, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора, що що можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

Ключові слова: хромосомна нестабільність, блеомицин, лімфоцити людини.

Резюме

Дыбский С.С. Использование дополнительной мутагенной нагрузки блеомицином *in vitro* для определения скрытой хромосомной нестабильности в лимфоцитах периферической крови человека.

Разработана модельная система для исследования скрытой хромосомной нестабильности в соматических клетках человека с помощью дополнительной тестирующей мутагенной нагрузки блеомицином *in vitro*. Определены оптимальные сроки обработки культуры лимфоцитов блеомицином (поздняя постсинтетична G2 стадия митотичного цикла) и оптимальные концентрации препарата (0,05 и 5,00 мкг/мл), пригодные для оценки чувствительности хромосом соматических клеток человека *in vitro* к мутагенной нагрузке. Установлено, что основным критерием чувствительности хромосом к тестирующему мутагенному действию блеомицина целесообразно считать общую частоту аберраций хромосом, а не aberrant metaphases. На отработанной модели проведены исследования скрытой хромосомной нестабильности у 9-ти лиц из контрольной группы. Вывявлено трех индивидов, гиперчувствительных к действию мутагена-провокатора, что можно считать генетически детерминированной скрытой хромосомной нестабильностью.

Ключевые слова: хромосомная нестабильность, блеомицин, лимфоциты человека.

Summary

Dibsky S.S. Use of bleomycin testing mutagenic exposure *in vitro* for determination of hidden chromosome instability in human lymphocytes of blood.

The model system for the investigation of hidden chromosome instability in somatic human cells by means of bleomycin testing mutagenic exposure *in vitro* had been elaborated. The optimal terms of treatment by bleomycin of human peripheral blood lymphocytes culture (late post-synthetic G2 phase of mitotic cycle) as well as optimal concentrations of bleomycin (0,05 and 5,00 mcg/ml) for the evaluation of human chromosomes sensitivity to mutagenic exposure *in vitro* had been suggested. It had been showed that the main criterion of chromosomes sensitivity to bleomycin exposure must be total frequency of chromosome aberrations (but not aberrant metaphases). With the help of modifying "G2-bleomycin sensitivity assay" the investigation of hidden chromosomes instability in 9 healthy donors had been fulfilled. Three hypersensitive persons had been identified that can be considered as genetically caused phenomenon.

Key words: chromosomes instability, bleomycin, human, lymphocytes.

Рецензент: д.біол.н., проф. О.М.Дуган

УДК 575.162: 575.113.2: 577.215.3

ПОШУК АЛЕЛЬНИХ ФОРМ ГЕНА SWS DROSOPHILA MELANOGASTER

Н.П.Матійців, Д.В.Максимів

Львівський національний університет імені Івана Франка

Вступ

Важливим є дослідження процесів нейродегенерації, їх молекулярної та генетичної природи. Зниження надійності механізмів регуляції і адаптивних можливостей організму під час старіння створюють умови для розвитку вікових патологій, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, Гентінгтона, аміотрофічний боковий склероз, атаксійні синдроми, пріонові захворювання та інші, які призводять до фізичних, розумових розладів та смерті [5]. Враховуючи значний рівень консервативності генетичних, молекулярних та клітинних процесів у дрозофіли та ссавців, що було встановлено протягом останнього десятиліття, *D. melanogaster* залишається надійною модельною системою, до якої можна скерувати новітні біологічні проблеми, в тому числі, пов'язані із захворюваннями людини. Роботи з використанням дрозофіли, спрямовані на виявлення генів залучених у формуванні спадкових форм нейродегенеративних захворювань, зробили значний внесок у їх розуміння [8; 9]. Більше того, ці дослідження дали початок пізнанню молекулярних складових, які задіяні у патогенезі, а отже, можуть створити основу нових стратегій лікування. Описано близько двадцяти мутантів дрозофіли з нейродегенеративним фенотипом [7]. Одною з найперших і найкраще вивченою є мутація в гені swiss cheese (sws). Мозок мутантів sws характеризується гіперзакручуванням глії навколо нейронів і подальшою вакуолізацією та відмиранням нейронів шляхом апоптозу [6]. Однак до цього часу молекулярно-генетичний механізм розвитку нейродегенерації, спричиненої мутацією у цьому гені, залишається не цілком зрозумілим. Виявлення та вив-