

УДК. 612.014.482:575.191

ХАРАКТЕР ДОЗОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЗДОРОВОГО ДОНОРА И ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ БОЛЬНОЙ ПРИ ТЕСТИРУЮЩЕМ γ -ОБЛУЧЕНИИ

**В.Н.Шкарупа, Э.А.Демина, Е.Н.Демченко,
В.М.Михайленко, И.Р.Барияк, В.С.Иванкова**
*ДУ «Науковий центр радіаційної медицини АМН України»
Институт експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Е. Кавецького (Київ)*

Введение

Согласно современным представлениям, радиочувствительность клеток и организма в целом в значительной мере определяется его репаративным потенциалом, тесно связанным с иммунной системой. Количественная характеристика митотической активности актуальна для изучения функциональной активности класса пролиферирующих клеток, прежде всего, иммунокомпетентных - лимфоцитов крови человека, являющихся "индикаторами" при действии ионизирующих излучений. Известно модифицирующее влияние задержки пролиферации лимфоцитов, подвергнутых облучению в больших дозах. По данным работы [1] повышение дозы на 1 Гр вызывает прирост лимфоцитов 1-го митоза в культуре на 6-12% и задерживает пролиферацию клеток примерно на 1 час. При этом необлученные лимфоциты вступают в первый митоз раньше, чем облученные, а клетки с единичными абберациями хромосом раньше, чем с множественными. Полученные результаты авторы рекомендуют использовать при проведении биологической (цитогенетической) дозиметрии. Однако характер дозовой зависимости митотической активности лимфоцитов человека при действии радиации в диапазоне малых и средних доз изучен недостаточно.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

В настоящей работе поставлена **цель** изучить и сравнить характер дозовой зависимости митотической активности лимфоцитов крови условно здорового донора и онкологической больной при облучении клеток *in vitro* в широком диапазоне доз.

Материалы и методы исследования

Материалом для цитогенетических исследований были лимфоциты периферической крови условно здорового донора и больной с онкогинекологической патологией одной возрастной категории. Облучение образцов крови осуществляли на терапевтическом аппарате "Рокус" с источником γ -лучей ^{60}Co в диапазоне доз: 0,1 - 1,0 Гр (при мощности дозы 1,5 Гр/мин). После стимуляции ФГА (Sigma, США) культивирование проводили на протяжении 52 часов (последние 2ч - с коллемеидом), что позволяет анализировать клетки в первом послерадиационном митозе [2].

В качестве критерия пролиферативной активности использовали митотический индекс (МИ). Для этого определяли долю ядер, находящихся на стадии митоза, при тотальном подсчете ядер на каждый препарат. В отличие от общепринятой методики [3], для уменьшения стандартной ошибки и объективизации различий среднего между группами, в среднем анализировали не 1000, а по 2000-3000 клеток на препарат (в каждом из 12 наблюдений). Результаты экспериментальных данных обрабатывались с использованием общепринятых методов вариационной статистики [4].

Полученные результаты и их обсуждение

Как следует из данных, представленных на рисунке 1, МИ необлученных лимфоцитов в культуре клеток здорового донора составлял $47,96 \pm 3,70\%$, что согласуется с современными данными литературы (40-60%) [цит. по 5].

Анализируя характер дозовой зависимости митотической активности лимфоцитов условно здорового донора следует отметить достоверное ($p < 0,05$) стимулирующее влияние γ -облучения в диапазоне малых доз: от 0,1 Гр (МИ = $56,84 \pm 3,87\%$) до 0,3 Гр (МИ = $66,29 \pm 5,92\%$), с образованием плато в интервале 0,2-0,3 Гр (МИ составлял $70,10 \pm 6,10\%$ и $66,29 \pm 5,92\%$, соответственно) с последующим снижением (начиная с дозы

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

0,5 Гр) пролиферативного потенциала до значений ниже контрольного уровня. МИ при облучении в дозах 0,5 и 1,0 Гр составлял $34,38 \pm 3,50\%$ и $32,01 \pm 5,48\%$, соответственно.

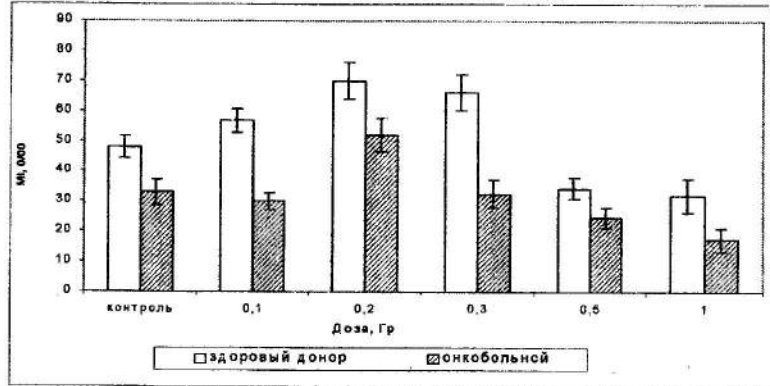


Рис. 1. Митотическая активность в культуре лимфоцитов периферической крови условно здорового донора и онкобольной при тестирующем γ -облучении.

Пролиферативная активность необлученных и стимулированных ФГА лимфоцитов онкологической больной статистически достоверно ($p < 0,05$) меньше значений данного показателя у условно здорового донора (МИ = $32,94 \pm 4,22\%$ и $47,96 \pm 3,70\%$, соответственно), что на наш взгляд может быть связано с иммунодепрессией, обусловленной онкологическим процессом. Для зависимости "доза-эффект", полученной на лимфоцитах больной, характерно достоверное повышение митотической активности только для дозы 0,2 Гр (МИ = $51,96 \pm 5,62\%$). А далее, с повышением дозы облучения отмечается ее снижение до значений ниже, чем контрольный уровень.

Таким образом, сходность характера полученных дозовых зависимостей заключается в стимулирующем влиянии малой дозы (0,2 Гр) на митотическую активность лимфоцитов и её последующем снижении при повышении лучевой нагрузки (0,5-1,0 Гр).

Малые лимфоциты представляют собой метаболически малоактивные клетки, находящиеся в G0 периоде клеточного цикла. При взаимодействии с митогеном лимфоцит способен

активироваться, т.е. происходит ряд метаболических изменений, которые в конечном итоге могут привести к бласттрансформации, используемой для функциональной оценки пролиферативной активности лимфоцитов. Предварительно можно констатировать, что иммунокомпетентные клетки при развитии злокачественных образований менее чувствительны к действию митогена, как в интактном, так и в облученном состоянии. Одной из причин наблюдаемой меньшей чувствительности соматических клеток опухоленосителя к действию митогена, может быть развитие иммунных реакций его организма на развитие опухоли, в т.ч. увеличение циркуляции в крови факторов, ингибирующих пролиферацию. Вместе с тем, критической точкой для стимуляции пролиферации, как у условно здорового донора, так и у онкобольной оказалась доза 0,2 Гр.

В работе, выполненной на лимфоцитах участников ликвидации аварии на ЧАЭС, которые получили дозы более 0,2-0,5 Гр выявлено задержку деления клеток на разных стадиях пролиферативного цикла. При дозах, не превышающих 0,2 Гр, на протяжении 3-6 лет после облучения определяли повышенное содержание лимфоцитов в S-фазе синтеза ДНК и увеличение пропорции лимфоцитов, которые вступают в пролиферативный цикл (G1-фаза). При этом выявлена корреляция между количеством G1 клеток и экспрессией антигена CD95, который является маркером популяции, способной к апоптозу. В качестве возможного объяснения авторы предполагают включение неспецифических адаптивных механизмов, которые запускают как клеточную пролиферацию, так и апоптотически обусловленные летальные эффекты [6].

Важную роль при действии радиации в малых дозах, по-видимому, играет элиминация (апоптоз) чувствительных клонов клеток со слабой антиоксидантной и репаративной способностью [7]. Кроме того, клетки "не справившиеся" с повреждениями и погибающие быстро замещаются за счет пролиферации устойчивых соседних клеток. Это так называемая апоптоз-индуцированная компенсаторная пролиферация. Дело в том, что погибающие клетки выделяют цитокины, стимули-

рующие пролиферацию соседних клеток [8]. При облучении диплоидных клеток человека в дозе 2 сГр и 5 сГр была выявлена активация митоген-активируемых протеинкиназ, связанных с делением клетки [9, 10]. В отличие от полученных нами результатов, верхняя граница малых доз, стимулирующих пролиферацию, не превышала 0,1 Гр [8-10]. При этом следует подчеркнуть, что в большинстве вышеуказанных работ исследовалась реакция не митоген-стимулированных клеток; а критерием пролиферативной активности служило общее увеличение содержания клеток в культуре (а не бластов).

Выводы

1. Выявлено стимулирующее влияние γ -облучения в диапазоне малых доз от 0,1 Гр до 0,3 Гр на митотическую активность лимфоцитов периферической крови условно здорового донора, с образованием плато в интервале 0,2 - 0,3 Гр и последующим снижением (начиная с дозы 0,5 Гр) пролиферативного потенциала до значений ниже контрольного уровня.

2. Иммунокомпетентные клетки опухоленосителя менее чувствительны к действию митогена, как в интактном, так и в облученном состоянии. Критической точкой для стимуляции пролиферации, как у условно здорового донора, так и у онкобольной оказалась доза 0,2 Гр.

3. Дальнейшие исследования мы связываем с сопоставлением полученных и проанализированных нами дозовых кривых с аналогичными кривыми выхода хромосомных aberrаций в лимфоцитах, облученных в аналогичных условиях.

Литература

1. Пяткин Е.К. Пролиферативная активность и частота aberrаций хромосом в первом митозе в 50-60-70-часовых культурах облученных лимфоцитов и в смешанных культурах облученных и необлученных клеток / Е.К.Пяткин, В.Ю.Нугис, В.Н.Покровская // Радиобиология. - 1984. - Вып. 3. - С.310-314.
2. Дубинина Л.Г. Лейкоциты крови человека - тест-система для оценки мутагенов среды / Дубинина Л.Г. - М.: Наука, 1977. - 152 с.

3. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств. Методические рекомендации [Электронный ресурс] / А.Д. Дурнев, Ю.А. Ревазова, О.Л. Верстакова [и др.] // Биомедицинский журнал. - Режим доступа до журналу : <http://www.Medline.ru>

4. Лакин Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф. - М.: Высшая школа, 1980. - 293 с.

5. Радиационная цитогенетика. Русско-английский словарь-справочник / Э.А. Демина, М.А. Пилинская, Ю.И. Петунин, Д.А. Ключин. - Київ: Здоров'я, 2009. - 368 с.

6. Романенко А.Ю. Біологічні ефекти низьких доз іонізуючого опромінення / А.Ю.Романенко // Журнал АМН України. - 1999. - Т.5, № 2. - С.199-209.

7. Москалев А.А. Генетические исследования влияния ионизирующей радиации в малых дозах на продолжительность жизни / А.А.Москалев // Рад. биология. Радиоэкол. - 2008. - Т. 48, № 2. - С.139-145.

8. DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation / S.Kondo, N.Senoo-Matsuda, Y.Hiromi, M.Miura // Mol. Cell Biol. - 2006. - V. 26, № 19. - P. 7258-7268.

9. Suzuki K. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells / K.Suzuki, S.Kodama, M.Watanabe // Cancer Res. - 2001. - Vol. 61. - P. 5396-5401.

10. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of raf and akt / C.S.Kim, J.K.Kim, S.Y.Nam [e.a.] // Mol. Cells. - 2009. - Vol. 24, № 3. - P. 424-430.

Резюме

Шкарупа В.Н., Демина Э.А., Демченко Е.Н., Михайленко В.М., Бариляк И.Р., Иванкова В.С. Характер дозовой зависимости митотической активности в культуре лимфоцитов крови здорового донора и онкологической больной при тестирующем γ -облучении.

Выявлено стимулирующее влияние γ -облучения в диапазоне малых доз от 0,1 Гр до 0,3 Гр на митотическую активность лимфоцитов периферической крови условно здорового донора, с образованием пла-

то в інтервалі 0,2 - 0,3 Гр і послідуєчим зниженням (начинає з дози 0,5 Гр) проліферативного потенціала до значень нижче контрольного рівня. Імуннокомпетентні клітини опухоленосителя менше чутливі до дії митогена, як в інтактному, так і в облученому стані. Критичною точкою для стимуляції проліферації, як у умовно здорового донора, так і у онкобольної оказалась доза 0,2 Гр.

Ключевые слова: γ -облучение, митотическая активность лимфоцитов.

Резюме

Шкарупа В.М., Дьоміна Е.А., Демченко О.М., Михайленко В.М., Баріляк І.Р., Іванкова В.С. *Характер дозової залежності митотичної активності в культурі лімфоцитів крові умовно здорового донора і онкологічної хворої при тестуючому γ -опроміненні.*

Виявлено стимулюючий вплив γ -опромінення в діалозоні малих доз від 0,1 Гр до 0,3 Гр на митотичну активність лімфоцитів периферичної крові умовно здорового донора, з утворенням плато в інтервалі 0,2 - 0,3 Гр та наступним зниженням (починаючи з дози 0,5 Гр) проліферативного потенціалу до значень нижче контрольного рівня. Імунокомпетентні клітини пухлиноносія менш чутливі до дії митогену, як в інтактному, так і в опроміненому стані. Критичною точкою для стимуляції проліферації, як в умовно здорового донора, так і у онкохворої виявилась доза 0,2 Гр.

Ключові слова: γ -опромінення, митотична активність лімфоцитів.

Summary

Shkarupa V.N., Demina E.A., Demchenko O.M., Mikhailenko V.M., Barylak I.R., Ivankova V.S. *Character of dose-response dependence of mitotic activity in culture of blood lymphocytes of the healthy donor and the cancer patient at the testing γ -irradiation.*

Stimulating influence of γ -irradiation in a range of small doses from 0,1 Gy up to 0,3 Gy on mitotic activity of peripheral blood lymphocytes of conditionally healthy donor, with formation of a plateau in an interval 0,2 - 0,3 Gy and the subsequent decrease (dose of 0,5 Gy) of proliferation potential up to values below a control level is revealed. The lymphocytes of peripheral blood of cancer patient are less sensitive to mitogen action, both in intact, and in the irradiated condition. A critical point for stimulation of proliferation for both conditionally healthy donor, and cancer patient was a dose of 0,2 Gy.

Key words: γ -irradiation, mitotic activity of lymphocytes.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М. Федченко

ЕКОЛОГІЧНА І КЛІНІЧНА ІМУНОЛОГІЯ ТА ІМУНОРЕАБІЛІТАЦІЯ