

16. Eckhardt, U., Grimm, B., Hortensteiner, S. (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 56 (1), 1–14. doi: <http://doi.org/10.1007/s11103-004-2331-3>

17. Costa, L. C. do B., Pinto, J. E. B. P., Castro, E. M. de, Alves, E., Bertolucci, S. K. V., Rosal, L. F. (2010). Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. *Bragantia*, 69 (2), 349–359. doi: <http://doi.org/10.1590/s0006-87052010000200012>

Received date 28.05.2019

Accepted date 17.06.2019

Published date 30.06.2019

Бойко Людмила Іванівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу, Відділ інтродукції та акліматизації рослин, Криворізький ботанічний сад Національної академії наук України, вул. Маршака, 50, м. Кривий Ріг, Україна, 50089
E-mail: ludmilaboiko@meta.ua

УДК 615.849:575.22

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.178907

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ У ЛІМФОЦИТАХ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ДЖЕРЕЛА ОПРОМІНЕННЯ ТА ЛОКАЛЬНОСТІ РАДІАЦІЙНОГО ВПЛИВУ У ЕКСПЕРИМЕНТІ *EX VIVO*

Н. О. Мазник, Т. С. Сипко, В. П. Старенький

Мета: Оцінка виходу цитогенетичних пошкоджень та їх поклітинного розподілу у донорських лімфоцитах онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин в залежності від джерела опромінення та локальності радіаційного впливу у терапевтично значущій дозі в експерименті *ex vivo*.

Методи: Цитогенетичний аналіз проводили із використанням лімфоцитів від 30 онкогінекологічних хворих, хворих на рак легені та з пухлинами голови та шиї до початку променевого лікування. Цільну периферичну кров опромінювали в дозі 2 Гр з подальшою симуляцією локального опромінення, застосовуючи гамма-опромінення ^{60}Co на апараті РОКУС-АМ та мегавольтне опромінення на лінійному прискорювачі Clinac 600С.

Результати дослідження: Показано підвищення частоти радіаційно-специфічних пошкоджень хромосом при гамма- та мегавольтному опроміненні лімфоцитів онкологічних хворих в дозі 2 Гр. При цьому, на фоні відсутньої залежності від локалізації пухлин, встановлено статистично значуще перевищення рівня хромосомних обмінів при опроміненні на лінійному прискорювачі відносно значень цих показників при використанні гамма-апарата. На точці 2 Гр з симуляцією локального опромінення спостерігали аналогічну залежність від застосованого джерела. Так, приріст загального рівня аберацій хромосомного типу відбувся за рахунок підвищення кількості дицентричних та кільцевих хромосом у 2,5 рази за дії гамма-опромінення та у 5 разів при мегавольтному опроміненні. За симуляції локального опромінення для обох джерел показано вірогідне перевищення рівня аберацій хромосомного типу над значеннями на нульовій точці, а розподіл дицентриків по клітинах був наддисперсним відносно статистики Пуассона.

Висновки: Цитогенетичне дослідження у експерименті *ex vivo* показало, що у донорських лімфоцитах, незалежно від локалізації пухлин, мегавольтне опромінення проявляє більш генотоксичний ефект у порівнянні з гамма-опроміненням. Отримані данні свідчать, що запропонована тестова модель опромінення *ex vivo* з симуляцією локального опромінення може успішно використовуватись для детекції факту опромінення та підтвердження, за наявності, його локальності. Результати дослідження сприятимуть удосконаленню радіобіологічного супроводу променевого лікування онкологічних хворих та можуть бути використані при розробці підходів до індивідуалізації терапевтичного опромінення

Ключові слова: аберації хромосом, онкологічні хворі, лімфоцити, експеримент *ex vivo*, симуляція локального опромінення, гамма-опромінення, мегавольтне опромінення на лінійному прискорювачі

Copyright © 2019, N. Maznyk, T. Sypko, V. Starenkiy.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

1. Вступ

Сьогодні променеве лікування безсумнівно є одним з найбільш дієвих методів боротьби з онкопатологією [1]. Проте цей вид протипухлинної терапії

також має і ряд негативних ефектів, таких як променеві реакції та вторинний канцерогенез, що пов'язані із залученням непухлинних тканин до осередку радіаційного впливу. Тож вдосконалення променевої те-

рапії розвивається у двох пріоритетних напрямках – з одного боку, підвищення ефективності лікування, з іншого боку, мінімізація несприятливих наслідків опромінення для непухлинних тканин [2]. У зв'язку з цим проводиться розробка нових підходів у лікуванні онкологічних хворих, пов'язана з модернізацією вже існуючого та винаходом нового устаткування з використанням принципово нових джерел опромінення. Водночас ведеться пошук методів оцінки радіочутливості у онкологічних пацієнтів та проводяться спроби віднайти критерії до індивідуалізації променевого лікування. Все це обумовлює необхідність різнопланових досліджень з визначення ефектів радіаційного впливу в умовах *in vivo* та *in vitro*.

2. Літературний огляд

Сьогодні проводиться багато досліджень, покликаних підвищити результативність променевого лікування. Це можливо досягти, зокрема, за рахунок попередження або зменшення вірогідності незапланованих перерв у променевому лікуванні, що пов'язані з променевими ускладненнями та технічною специфікою терапевтичного опромінення [3, 4]. В світлі цього постає актуальна задача радіобіології – розробити радіобіологічне підґрунтя для індивідуалізації променевої терапії. Вирішення даного питання можливе лише за чіткого розуміння всіх тонкощів процесу, що відбуваються під час локального фракціонованого опромінення. Ситуація ускладнюється наявністю широкого спектру джерел опромінення, що застосовуються у променевій терапії, а також багатьма супутніми факторами, що впливають на кінцевий вихід цитогенетичних пошкоджень.

Багато досліджень спрямовані на вивчення зв'язку між віком, статтю, етнічною належністю та індивідуальною радіочутливістю. У одному з досліджень було показано, що при опроміненні лімфоцитів здорових донорів у дозі 0,1–0,5 Гр частота мікроядер закономірно зростала з підвищенням дози, при цьому підвищення зазначеного цитогенетичного показника не мало зв'язку із статтю обстежених, але суттєво залежало від віку – найбільш радіочутливими виявились донори у віці 20–40 років, найменшого впливу зазнавали особи віком 12–20 років, що, на думку авторів, може бути опосередковано пов'язано з більшим потенціалом системи репарації у молодому віці [5]. Останнім часом інтенсивно проводиться пошук біомаркерів радіаційного ураження для прогнозування ризиків променевого ураження організму та розвитку радіогенної патології [6]. Проте ці дослідження не завжди є успішними, бо не вдається відтворити результати попередніх тестів [7, 8]. Низка досліджень присвячена вивченню причин та механізмів, що обумовлюють підвищену радіочутливість [9, 10]. Існують також труднощі аналізу та співставлення отриманих у різних дослідженнях даних. Оцінка впливу проліферативної активності клітин на зміни кількості гамма-H2AX фокусів за дії опромінення у малих та середніх дозах виявила труднощі для коректної інтерпретації отриманих результатів з підрахунку гамма-H2AX фокусів у асинхронній культурі фібробластів шкіри людини [11].

Для розуміння цитогенетичних процесів, що відбуваються за дії часткового опромінення, дуже важливими є експерименти з симуляцією локальності опромінення. Проте ці дослідження є досить нечисельними та здійснюються переважно у клітинах здорових донорів [12]. Однак більш доцільніше було б використання клітини онкологічних хворих, бо, як відомо, рівень цитогенетичних пошкоджень у осіб цього контингенту ще до початку променевого лікування є підвищеним відносно загальнопопуляційних значень [13].

Таким чином, постійне залучення нових джерел радіаційного впливу до лікувальної практики на фоні недостатніх знань щодо особливостей формування цитогенетичних пошкоджень при використанні різних видів променевої терапії за дії локального фракціонованого опромінення як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* та *ex vivo*, зумовлює необхідність поглиблених досліджень у цьому напрямку.

3. Мета та задачі дослідження

Мета представленої роботи полягає у оцінці виходу цитогенетичних пошкоджень та їх поклітинного розподілу у донорських лімфоцитах онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин в залежності від джерела опромінення та локальності радіаційного впливу у терапевтично значущій дозі в експерименті *ex vivo*.

Згідно поставленої мети під час виконання експерименту до вирішення було заплановано наступні задачі:

1. За рівнем радіаційно-індукованих перебудов оцінити вплив γ - ^{60}Co та мегавольтного опромінення на лімфоцити онкогінекологічних хворих, хворих на рак легені та з пухлинами голови та ший.

2. Встановити залежність виходу цитогенетичних пошкоджень від ступеня локальності у донорських лімфоцитах хворих з різними локалізаціями пухлин.

3. Визначити можливість детекції опромінення та його локальності за рівнем і розподілом аберацій хромосом по клітинах, опромінені у терапевтично значущій дозі із симуляцією локальності радіаційного впливу.

4. Матеріали та методи

Використання біологічного матеріалу здійснювали за інформованої згоди донорів з дотриманням всіх біоетичних регламентів. Для проведення даного радіобіологічного експерименту застосовано лімфоцити периферичної крові 30 онкологічних хворих (15 чоловіків та 15 жінок), серед яких було 13 онкогінекологічних хворих (РТМ), 9 хворих на недрібноклітинний рак легені (РЛ) та 8 хворих з пухлинами голови та ший (РГШ). Вік хворих коливався в межах 53–79 років, а середньогруповий вік дорівнював $65,2 \pm 1,5$ роки. Зразки крові було опромінено на апараті РОКУС-АМ для 12 донорів та на лінійному прискорювачі Сінас 600С – для 18 донорів.

Збір біоматеріалу у хворих здійснювали перед початком променевого лікування. Опромінення

крові *ex vivo*, умови якого відповідали міжнародним рекомендаціям [14], проводили в дозі 2 Гр із використанням джерела ^{60}Co на апараті РОКУС-АМ та на лінійному прискорювачі електронів Сінас 600С. Умови гамма-опромінення були наступні: відстань між зразками з кров'ю та джерелом 75 см, потужність поглинутої дози коливалась від 0,47 до 0,63 Гр/хв, енергія випромінювання 1,25 МеВ. При мегавольтовому опроміненні дистанція від зразків до джерела дорівнювала 100 см, потужність поглинутої дози становила 2,5 Гр/хв за енергії фотонного випромінювання 6 МеВ. При обох типах опромінення поле опромінення та товщина слою крові були однаковими. Після опромінення зразки крові витримували у медичному біксі в темряві при кімнатній температурі.

Дослідження *ex vivo* проводили на трьох експериментальних точках. В першому варіанті до культуральної суміші додавали 0,5 мл цільної крові, опроміненої в дозі 2 Гр. В іншому випадку для симуляції локального опромінення додавали 0,45 мл цільної неопроміненої крові та 0,05 мл крові, опроміненої в дозі 2 Гр. Третю експериментальну точку складали культури з додаванням 0,5 мл цільної неопроміненої крові.

За умов стандартної методики лімфоцити культивували 50–54 год при температурі 37,5 °С [14]. Суміш для культивування на основі середовища Ігла та RPMI 1640 у співвідношенні 1:1 містила 20 % сироватки великої рогатої худоби, 2 % бромдезоксиридину та 2 % фітогемагглютиніну. Для зупинки поділу клітин додавали колхіцин або колцемід, після чого через 4 год проводили гіпотонічну обробку хлоридом калію с подальшою фіксацією клітин сумішшю метанолу і крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Суспензію метафазних клітин на предметному склі фарбували за

допомогою Гімза- або флуоресцентного-плюс-Гімза (FPG) забарвлення.

Аналізуючи кодовані препарати за загальноприйнятими критеріями [14], в аберантних клітинах (А Кл) реєстрували весь спектр аберацій хромосом (А Хр). У роботі представлено отримані дані для аберацій хромосомного типу (А Хс), таких як дицентричні хромосоми с супутніми фрагментами (Диц), центричні кільця с супутніми фрагментами (ЦК), вільні ацентричні хромосомні фрагменти (Ац Фр) та стабільні аберації хромосом, що розпізнавались без каріотипування (Стаб Аб).

Під час статистичної обробки середні рівні (Y) аберантних клітин та аберацій хромосом визначали у розрахунку на 100 проаналізованих нормоплоїдних клітин. Стандартні похибки середніх рівнів цитогенетичних пошкоджень (SE) обчислювали з урахуванням дисперсії поклітинних розподілів аберацій (σ^2) в об'єднаних вибірках метафаз. Оцінку рандомізованості поклітинного розподілу аберацій хромосом проводили за відношенням дисперсії до середнього (σ^2/Y) та за u-тестом Папворта (u) [15]. Вірогідність різниці між середніми значеннями цитогенетичних показників визначали за t-критерієм Стьюдента [16].

5. Результати досліджень та їх обговорення

В експерименті з тестовим опроміненням та симуляцією локального опромінення, до якого було залучено 30 онкологічних пацієнтів, проаналізовано 15973 клітини на 79 точках дослідження.

Було проаналізовано рівень окремих видів цитогенетичних пошкоджень хромосомного типу у об'єднаних вибірках клітин від онкологічних хворих з різними локалізаціями пухлин до початку променевого лікування, що є нульовою дозовою точкою для експерименту *ex vivo*. Ці дані було співставлено з групою лабораторного контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Загальні цитогенетичні пошкодження хромосом та аберації хромосомного типу у лімфоцитах онкологічних хворих до опромінення *ex vivo*

Група	Y±SE на 100 клітин				
	А Кл	А Хр	А Хс	Диц	Ац Фр
РТМ	4,28±0,34	4,56±0,35	2,09±0,24	0,33±0,10	1,73±0,22
РЛ	5,27±0,47	5,53±0,48	2,02±0,29	0,38±0,13	1,52±0,25
РГШ	2,89±0,33	3,14±0,34	1,94±0,27	0,18±0,08	1,68±0,25
Лабораторний контроль	1,64±0,14	1,65±0,14	0,88±0,15	0,08±0,02	0,80±0,15

Рівень А Кл та А Хр в усіх групах пацієнтів до ПТ перевищував контрольні значення (для групи РТМ: $t=8,42$ та $t=9,10$; для групи РЛ: $t=9,88$ та $t=10,41$; для групи РГШ: $t=4,03$ та $t=4,73$, відповідно; $p<0,001$).

Середній сумарний рівень А Хс у групах РТМ, РЛ та РГШ вірогідно перевищував значення у групі порівняння ($t=5,39$, $t=4,58$ та $t=4,45$; $p<0,001$, відповідно), але не мав статистично значущої різниці між зазначеними групами хворих ($p>0,05$). При аналізі частоти окремих видів пошкоджень хромосомного типу для рівня Диц було показано перевищення контрольних значень у групах РТМ та РЛ ($t=3,14$; $p<0,01$ та $t=3,33$; $p<0,001$, відповідно), для групи

РГШ вірогідної різниці виявлено не було ($t=1,42$; $p>0,05$).

У випадку Ац Фр за відсутності вірогідної різниці між собою, у всіх досліджуваних групах середній рівень зазначеного показника перевищував спонтанні значення приблизно у 2 рази ($t=4,49$; $p<0,001$, $t=3,13$; $p<0,01$ та $t=3,93$; $p<0,001$, для РТМ, РЛ та РГШ, відповідно).

Таким чином, у онкогінекологічних хворих, хворих на рак легені та з пухлинами голови та ший ще до проведення променевого лікування середні рівні цитогенетичних показників вірогідно перевищували спонтанні значення. При цьому відсутність вірогідної різниці для цих показників поміж досліджу-

ваними групами дозволяє у випадку потреби об'єднати вибірки клітин від пацієнтів незалежно від локалізації пухлин.

Після гамма- та мегавольтного опромінення у дозі 2 Гр сумарні значення цитогенетичних показників стрімко зростали (табл. 2, 3).

Таблиця 2

Загальні цитогенетичні пошкодження хромосом та аберації хромосомного типу у лімфоцитах онкологічних хворих після гамма-опромінення *ex vivo* в дозі 2 Гр

Група	Y±SE на 100 клітин				
	А Кл	А Хр	А Хс	Диц	Ац Фр
РТМ	32,19±1,99	42,11±2,27	38,68±2,18	18,12±1,49	16,40±1,42
РЛ	37,07±4,01	46,98±4,51	41,81±4,25	24,14±3,23	15,09±2,56
РГШ	30,45±3,39	39,10±3,84	37,97±3,79	19,17±2,69	13,91±2,29

При опроміненні у дозі 2 Гр на апараті РО-КУС-АМ у групі хворих РТМ середньогруповий рівень А Кл підвищувався в 7,5 раза, а сумарний рівень А Хр – більш ніж у 9 разів. У хворих групи РЛ середній рівень А Кл та сумарний рівень А Хр зростали у 7 та 8,5 раза, відповідно. У групі РГШ середній рівень А Кл підвищувався у 10,5 раза, а сумарний рівень А Хр – в 12,5 раза. Розбіжностей за рівнями структурних перебудов хромосомного типу поміж всіма обстеженими групами пацієнтів на точці 2 Гр не було виявлено (для груп РТМ і РЛ $t=1,00$, для груп РТМ і РГШ $t=0,66$, для груп РЛ і РГШ $t=1,34$; $p>0,05$, відповідно).

Підвищення сумарного рівня А Хс від нульової точки до точки 2 Гр було забезпечено зростанням частоти обмінних та фрагментних аберацій. У хворих групи РТМ середньогруповий рівень Диц вірогідно зростав майже у 55 разів, у групі РЛ – у 63,5 раза та у

групі РГШ – рівно у 106,5 раза ($t=24,26$, $t=21,89$ та $t=21,68$; $p<0,001$, відповідно), а частота Ац Фр підвищувалась приблизно у 9,5, 10 та 8 разів, відповідно, при співставленні із значеннями до опромінення ($t=18,03$, $t=11,95$ та $t=11,45$; $p<0,001$, відповідно). Інтенсивність приросту рівня Диц при опроміненні в дозі 2 Гр була більш вираженою відносно рівня Ац Фр. Так співвідношення частоти Диц до Ац Фр у групі РТМ становило 1:0,91, у групі РЛ – 1:0,63 та у групі РГШ – 1:0,73.

У той же час, при очікуваному підвищенні сумарних частот А Хс та їх окремих видів, таких як Диц та Ац Фр, різниці на точці 2 Гр між всіма обстеженими групами хворих не було зафіксовано (для груп РТМ і РЛ $t=0,67$, $t=1,84$, $t=0,44$; для груп РТМ і РГШ $t=0,16$, $t=0,35$, $t=0,89$; для груп РЛ і РГШ $t=0,68$, $t=1,19$, $t=0,34$, відповідно; $p>0,05$).

Таблиця 3

Загальні цитогенетичні пошкодження хромосом та аберації хромосомного типу у лімфоцитах онкологічних хворих після мегавольтного опромінення *ex vivo* в дозі 2 Гр

Група	Y±SE на 100 клітин				
	А Кл	А Хр	А Хс	Диц	Ац Фр
РТМ	33,22±2,35	46,61±2,78	43,64±2,69	23,31±1,96	15,54±1,60
РЛ	36,45±2,24	50,07±2,63	46,63±2,53	25,31±1,87	15,68±1,47
РГШ	35,60±3,06	42,93±3,36	39,53±3,22	20,16±2,30	14,40±1,94

За дії мегавольтного опроміненні у дозі 2 Гр із використанням лінійного прискорювача у групі хворих РТМ середньогрупова частота А Кл зростала майже у 8 разів, а сумарний рівень А Хр – більш ніж у 10 разів. У хворих групи РЛ середній рівень А Кл та сумарний рівень А Хр підвищувався у 7 та 9 разів, відповідно. У групі РГШ середній рівень А Кл зростав більш ніж у 12 разів, а сумарний рівень А Хр – більш ніж у 13,5 раза. Розбіжностей за рівнями структурних перебудов хромосомного типу поміж обстеженими групами пацієнтів на точці 2 Гр не було виявлено (для груп РТМ і РЛ $t=0,90$, для груп РТМ і РГШ $t=0,84$, для груп РЛ і РГШ $t=1,64$; $p>0,05$, відповідно).

Зростання сумарної частоти А Хс від нульової точки до точки 2 Гр відбувалось внаслідок підвищення рівня обмінних та фрагментних пошкоджень. У хворих групи РТМ середньогруповий рівень Диц зростав із статистично значущою вірогідністю більш ніж у 70,5 раза, у групі РЛ – більш ніж у 66,5 раза та у групі РГШ – рівно у 112 разів ($t=27,58$, $t=23,57$ та

$t=22,57$; $p<0,001$, відповідно), а частота Ац Фр підвищувалась приблизно у 9, 10,5 та 8,5 разів, відповідно, у порівнянні із значеннями до опромінення ($t=16,36$, $t=15,19$ та $t=12,94$; $p<0,001$, відповідно). Швидкість підвищення частоти Диц за опромінення в дозі 2 Гр була вищою за темпи зростання рівня Ац Фр. Співвідношення частоти Диц до Ац Фр у групі РТМ дорівнювало 1:0,67, у групі РЛ – 1:0,62 та у групі РГШ – 1:0,71.

Як і у випадку гамма-опромінення, при мегавольтному опроміненні зростання рівня А Хс, Диц та Ац Фр не призводило до вірогідної різниці на точці 2 Гр між залученими до експерименту групами хворих (для груп РТМ і РЛ $t=0,81$, $t=0,74$, $t=0,07$; для груп РТМ і РГШ $t=0,97$, $t=1,03$, $t=0,45$; для груп РЛ і РГШ $t=1,69$, $t=1,68$, $t=0,52$, відповідно; $p>0,05$).

Таким чином відсутність при гамма- або мегавольтному опроміненні у дозі 2 Гр статистично значущих розбіжностей між рівнями аберацій хромосомного типу у групах обстежених хворих дозволяє

об'єднати вибірки клітин від груп пацієнтів з різними локалізаціями пухлин в межах даної експериментальної точки для оцінки впливу джерела опромінення на вихід цитогенетичних пошкоджень в експерименті *ex vivo* (табл. 4).

Рівні цитогенетичних показників у об'єднаних вибірках клітин, отриманих від онкогінекологічних пацієнтів, хворих на рак легені та з пухлинами голови та шиї, мали схожу за направленістю динамку їх змін від нульової точки до точки 2 Гр при опроміненні на апараті РОКУС-АМ та лінійному прискорювачі Clinac 600С. Однак слід зазначити, що темпи приросту частоти аберацій хромосомного типу були вище під час застосування мегавольтного опромінення, що і забезпечило вірогідну різницю у реалізації цитогенетичних ефектів за дії різних джерел опромінення. Сумарний рівень А Хр при мегавольтному опроміненні на лінійному прискорювачі перевищував аналогічний показник

при гамма-опроміненні ($t=1,99$; $p<0,05$), хоча вірогідна різниця для А Кл для досліджуваних джерел опромінення була відсутня ($t=1,13$; $p>0,05$). По відношенню до опромінення на гамма-апараті перевищення загального рівня А Хс за дії мегавольтного опромінення ($t=2,07$; $p<0,05$) відбувалось за рахунок Диц ($t=2,38$; $p<0,05$). Водночас, частота Ац Фр не мала вірогідної різниці при порівнянні значень цих цитогенетичних показників від досліджуваних джерел опромінення ($t=0,22$; $p>0,05$).

Відсутність залежності виходу аберацій хромосомного типу від локалізації пухлин на точці 2 Гр надає змогу аналізувати рівень цитогенетичних пошкоджень у об'єднаних вибірках клітин від хворих з різними локалізаціями пухлин на точці 2 Гр з розведенням 1:9 для вирішення питання з оцінки інформативності експериментальної моделі для детекції факту опромінення, а також, що не менш важливо, локальності цього опромінення (табл. 5).

Таблиця 4

Загальні цитогенетичні пошкодження хромосом та аберації хромосомного типу у лімфоцитах онкологічних хворих після гамма- та мегавольтного опромінення *ex vivo* в дозі 2 Гр

Група	Y±SE на 100 клітин				
	А Кл	А Хр	А Хс	Диц	Ац Фр
РОКУС-АМ	32,70±1,58	42,36±1,80	39,09±1,72	19,39±1,21	15,67±1,09
Clinac 600С	35,12±1,43	47,26±1,66	43,99±1,60	23,45±1,17	15,34±0,95

Таблиця 5

Загальні цитогенетичні пошкодження хромосом та аберації хромосомного типу у лімфоцитах онкологічних хворих після гамма- та мегавольтного опромінення *ex vivo* в дозі 2 Гр з розведенням 1:9

Група	Y±SE на 100 клітин				
	А Кл	А Хр	А Хс	Диц+ЦК	Ац Фр
РОКУС-АМ	5,57±0,72	5,94±0,74	3,25±0,55	0,74±0,26	2,13±0,45
Clinac 600С	6,64±0,46	7,76±0,50	5,03±0,40	1,54±0,22	3,30±0,33
Контроль на нульовій точці	4,12±0,22	4,38±0,22	2,02±0,15	0,30 ±0,06	1,66±0,14

Примітка: Диц+ЦК – сума дицентриків і центричних кілець з супутніми фрагментами

Направленість процесу змін цитогенетичних показників у об'єднаних вибірках клітин, отриманих від онкогінекологічних пацієнтів, хворих на рак легені та з пухлинами голови та шиї, була подібною від нульової точки до точки 2 Гр 1:9 при опроміненні на апараті РОКУС-АМ та лінійному прискорювачі Clinac 600С. На початку роботи було показано відсутність розбіжностей між значеннями структурних перебудов на нульовій точці між групами хворих з різними локалізаціями пухлин, тому в експерименті із симуляції локальності опромінення в якості нульової точки використовували вибірку клітин від онкологічних хворих до початку променевого лікування, об'єднаних незалежно від локалізації онкопатології та застосованого у подальшому джерела опромінення.

На точці 2 Гр з розведенням 1:9 після гамма-опромінення частота А Кл та А Хр зростала приблизно у 1,4 раза. За впливу мегавольтного опромінення відповідні показники підвищувались у 1,6 та 1,8 раза, відповідно.

При використанні обох джерел опромінення було показано вірогідне зростання рівня А Хс відно-

сно нульової точки. Це підвищення було забезпечено зростанням сумарної частоти дицентричних та кільцевих хромосом у 2,5 раза у випадку опромінення на апараті РОКУС-АМ ($t=2,34$; $p<0,05$) та у 5 разів за дії опромінення від лінійного прискорювача ($t=7,54$; $p<0,001$). Слід відзначити, що на точці 2 Гр 1:9 співвідношення рівня Диц+ЦК до Ац Фр було подібним для гамма- та мегавольтного опромінення і становило 1:2,9 та 1:2,1, відповідно.

Розподіли індивідуальних частот суми дицентриків та центричних кілець по клітинах характеризувались наддисперсністю відносно статистики Пуассона (для РОКУС-АМ: $\sigma^2/Y=1,24$, $u=6,05$; для Clinac 600С: $\sigma^2/Y=1,19$, $u=7,71$), що вказує на локальність опромінення [17].

Результати проведеного дослідження свідчать про більш генотоксичний вплив в умовах *ex vivo* на лімфоцити онкологічних хворих за дії мегавольтного опромінення на лінійному прискорювачі. При цьому не спостерігалось залежності від того, до якої групи за локалізацією пухлин відносились донори клітин. Крім того, у частині експерименту з опроміненням та подальшим розведенням 1:9 показана можливість ви-

явлення факту опромінення та успішної детекції його локального характеру. Дані, отримані при виконанні експерименту, підтверджують можливість використання запропонованої тестової моделі для дослідження впливу різних джерел опромінення на вихід та спектр цитогенетичних пошкоджень. Отримані дані є дуже важливими для коректної інтерпретації наслідків радіаційного впливу в умовах часткового опромінення, за якого процес утворення цитогенетичних пошкоджень має більш складну динаміку порівняно з локальним опроміненням. Слід зазначити, що робіт з вивчення саме особливостей впливу опромінення в залежності від його якості зустрічається не так багато та частіше ці дослідження відають перевагу співставленню джерел опромінення з різною ЛПЕ. Так в одному з досліджень показана більша ефективність опромінення протонами для формування мікроядер у лімфоцитах периферичної крові при порівнянні з рентгенівським опроміненням [18]. Схожі дані отримано при порівнянні ефектів гамма-опромінення та опромінення альфа-частками, за якого рівень аберацій хромосом був статистично вищим [19]. Результати дослідження, представлені у даній роботі, показали високу інформативність цитогенетичного аналізу не лише для порівняння джерел з високою та низькою ЛПЕ, як це показано в роботах інших дослідників, але використання даного методу дослідження є доцільним для виявлення різниці в радіобіологічних ефектах між джерелами опромінення тільки з низькою або тільки з високою ЛПЕ за різних енергій випромінювання. Також для вдосконалення системи радіобіологічного супроводу променевої терапії запропонована модель може бути застосована для виявлення випадків підвищеної радіочутливості у людини, зокрема у онкологічних хворих до початку терапевтичного опромінення. Для цього отримані дані

у експерименті *ex vivo* у подальшому будуть співставленні з результатами дослідження *in vivo*.

6. Висновки

1. В експерименті *ex vivo* з опромінення у дозі 2 Гр крові пацієнтів у групах РТМ, РЛ та РГШ як на апараті РОКУС-АМ, так і на лінійному прискорювачі Clinac 600С, було показано, що рівень загальних та радіаційно-індукованих хромосомних пошкоджень очікувано зростає, проте не залежав від локалізації пухлин. В об'єднаній в залежності від джерела опромінення вибірці клітин від онкопацієнтів з різними локалізаціями пухлин встановлено невелике, але вірогідне перевищення за рівнем аберацій хромосомного типу, зокрема дицентриків, значень у групі Clinac 600С при співставленні з групою РОКУС-АМ, що вказує на більший генотоксичний ефект мегавольтного опромінення.

2. Підвищення рівня радіаційно-індукованих аберацій в дозі 2 Гр з розведенням 1:9 відбувалось з різною швидкістю в залежності від джерела опромінення. Зростання частоти А Хс було забезпечено збільшенням кількості дицентричних та кільцевих хромосом у 2,5 раза для опромінення на апараті РОКУС-АМ та у 5 разів при опроміненні на лінійному прискорювачі.

3. Сумарний рівень А Хс та середній рівень Диц+ЦК на експериментальній точці опромінення *ex vivo* в дозі 2 Гр з розведенням 1:9 вірогідно перевищував відповідні значення у співставленні з нульовим контролем при обох джерелах опромінення. Розподіл Диц по клітинах був наддисперсним відносно статистики Пуассона, що підтверджує можливість використання обраної тестової моделі не тільки для детекції факту опромінення, але і для виявлення його локальності.

Література

1. Овчинников, В. А., Угляница, К. Н., Волков, В. Н. (2010). Современные методы лучевого лечения онкологических больных. Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 1 (29), 93–97.
2. Трофимова, О. П., Ткачев, С. И., Юрьева, Т. В. (2013). Прошлое и настоящее лучевой терапии в онкологии. Клиническая онкогематология, 6 (4), 355–364.
3. The timely delivery of radical radiotherapy: guidelines for the management of unscheduled treatment interruptions (2019). London: The Royal College of Radiologists, 37.
4. Diegues, S. S., Ciconelli, R. M., Segreto, R. A. (2008). Causes of unplanned interruption of radiotherapy. Radiologia Brasileira, 41 (2), 103–108. doi: <http://doi.org/10.1590/s0100-39842008000200009>
5. Демидов, В. В., Мельнов, С. Б., Рыбальченко, О. А. (2002). Оценка индивидуальной радиочувствительности у разновозрастных групп населения республики Беларусь. Сахаровские чтения. Минск, 83–85.
6. Шарьгин, В. Л. (2018). ЭПР-спектроскопия при системном анализе радиочувствительности / радиорезистентности организма. Опыт и тенденции. Радиационная биология. Радиоэкология, 58 (5), 463–476. doi: <http://doi.org/10.1134/s0869803118050168>
7. Andreassen, C. N. (2005). Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? Acta Oncologica, 44 (8), 801–815. doi: <http://doi.org/10.1080/02841860500374513>
8. Andreassen, C. N., Alsner, J. (2009). Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: A systematic review. Radiotherapy and Oncology, 92 (3), 299–309. doi: <http://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.015>
9. Rodrigues, A. S., Oliveira, N. G., Gil, O. M., Léonard, A., Rueff, J. (2005). Use of cytogenetic indicators in radiobiology. Radiation Protection Dosimetry, 115 (1-4), 455–460. doi: <http://doi.org/10.1093/rpd/nci072>
10. Greulich-Bode, K. M., Zimmermann, F., Müller, W.-U., Pakisch, B., Molls, M., Würschmidt, F. (2012). Clinical, Molecular- and Cytogenetic Analysis of a Case of Severe Radio-Sensitivity. Current Genomics, 13 (6), 426–432. doi: <http://doi.org/10.2174/138920212802510475>
11. Грехова, А. К., Пустовалова, М. В., Еремин, П. С., Яшкина, Е. И., Осипов, А. Н. (2018). Проблема анализа пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX в асинхронной клеточной популяции. Радиационная биология. Радиоэкология, 58 (5), 484–489. doi: <http://doi.org/10.1134/s0869803118050077>

12. Филюшкин, И. В., Нугис, В. Ю., Чистопольский, А. С. (1999). Сравнительный цитогенетический анализ культур облученных лимфоцитов и смешанных культур облученных и необлученных клеток. Медицинская радиология и радиационная безопасность, 44 (3), 19–26.
13. Семенов, А. В., Воробцова, И. Е. (2016). Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных с солидными опухолями. Вопросы онкологии, 62 (3), 485–489.
14. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies (2011). Vienna: International Atomic Energy Agency, 229.
15. Higuera, M., González, J. E., Di Giorgio, M., Barquinero, J. F. (2018). A note on Poisson goodness-of-fit tests for ionizing radiation induced chromosomal aberration samples. International Journal of Radiation Biology, 94 (7), 656–663. doi: <http://doi.org/10.1080/09553002.2018.1478012>
16. Атраментова, Л. А., Утевская, О. М. (2008). Статистические методы в биологии. Горловка: Видавництво Ліхтар, 248.
17. Senthamizhchelvan, S., Pant, G. S., Rath, G. K., Julka, P. K., Nair, O. (2009). Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. Physica Medica, 25 (2), 82–87. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ejmp.2008.05.004>
18. Mischczyk, J., Rawojć, K., Panek, A., Swakoń, J., Prasanna, P. G., Rydygier, M. (2015). Response of human lymphocytes to proton radiation of 60MeV compared to 250kV X-rays by the cytokinesis-block micronucleus assay. Radiotherapy and Oncology, 115 (1), 128–134. doi: <http://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.03.003>
19. Puig, R., Pujol, M., Barrios, L., Caballín, M. R., Barquinero, J.-F. (2016). Analysis of α -particle-induced chromosomal aberrations by chemically-induced PCC. Elaboration of dose-effect curves. International Journal of Radiation Biology, 92 (9), 493–501. doi: <http://doi.org/10.1080/09553002.2016.1206238>

Received date 02.05.2019

Accepted date 28.05.2019

Published date 30.06.2019

Мазник Наталія Олександрівна, доктор біологічних наук, завідувач лабораторії, Лабораторія радіаційної цитогенетики, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 82, м. Харків, Україна, 61024

Сипко Тетяна Сергіївна, науковий співробітник, Лабораторія радіаційної цитогенетики, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 82, м. Харків, Україна, 61024

Старенький Віктор Петрович, доктор медичних наук, професор, завідувач відділення, Відділення променевої терапії, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 82, м. Харків, Україна, 61024