

[]

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

Підстава: рішення проблемної комісії
«Медична генетика» МОЗ та
НАМН України,
протокол № 4/16 від 12.12. 16 р.

СПЕЦІАЛІСТАМ ГЕНЕТИЧНИХ
ЛАБОРАТОРІЙ, МЕДИКО-ГЕНЕТИЧНИХ
ЦЕНТРІВ ТА НАУКОВ-ДОСЛІДНИХ
УСТАНОВ

**СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО
ЕФЕКТУ І РІВНЯ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ВНАСЛІДОК ЕФЕКТУ
СВІДКА В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ЛЮДИНИ**

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:
ДУ «НАЦІОНАЛЬНИЙ
НАУКОВИЙ ЦЕНТР
РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ
НАМН УКРАЇНИ»

АВТОРИ:
канд. мед. наук Шеметун О.В.
канд. біол. наук Талан О.О.
канд. біол. наук Демченко О.М.
д-р мед. наук, проф. Пілінська М.А.

м. Київ

Суть впровадження:

Оцінка індивідуальної радіочутливості та прогнозування медичних наслідків дії іонізуючого випромінювання на організм людини

Пропонується для впровадження в практику генетичних лабораторій медико-генетичних центрів та науково-дослідних установ.

Розширення сфери використання іонізуючого випромінювання в промисловості та медицині призвело до зростання радіаційного навантаження на великі контингенти населення. Аберації хромосом, що індукуються в соматичних клітинах людини при дії іонізуючого випромінювання, складаються з пошкоджень генетичного апарату як в безпосередньо опромінених клітинах, так і в неопромінених клітинах організму, внаслідок індукції ефекту свідка. Паралельне визначення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту і рівня хромосомної нестабільності внаслідок ефекту свідка в лімфоцитах крові людини є необхідним для коректного прогнозування медичних наслідків дії іонізуючого випромінювання на організм людини .

Дослідження проведено в рамках виконання НДР «Дослідження спонтанної та радіаційно зумовленої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові осіб різного віку». № держреєстрації 0114U002847, термін виконання 2014-2016 рр.

Метою роботи була розробка ефективного способу встановлення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту і рівня хромосомної нестабільності внаслідок ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини.

При виконанні роботи проаналізовано 14041 диференційно G-зabarвлену метафазну пластинку з культури лімфоцитів периферичної крові людини.

Опис способу:

Культивування крові проводили за напівмікрометодом D. A. Hungerford (1965) у нашій модифікації.

Новим запропонованим нами підходом в оцінці радіаційно-індукованої хромосомної нестабільності є паралельне застосування культивування опроміненої *in vitro* цільної крові (для встановлення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту і оцінки радіочутливості) та культивування неопроміненої крові у змішаній культурі з опроміненими *in vitro* лімфоцитами крові осіб іншої статі (для виявлення хромосомної нестабільності внаслідок ефекту свідка). Достовірне підвищення, порівняно з контрольним рівнем, частоти аберацій хромосомного типу свідчить про опромінення лімфоцитів і є показником радіочутливості обстежених осіб. Підвищення частоти аберацій хроматидного типу в неопромінених лімфоцитах, що культивувались в змішаних культурах з опроміненими

клітинами, вказує на зростання хромосомної нестабільності, індукованої ефектом свідка.

При дослідженні використовують цільну венозну кров (~ 3 мл від однієї особи), яку вміщують в 5 мл стерильну пробірку з напленням гепарину (Sarstedt, Germany). Лімфоцити культивують у 15-ти мл стерильних одноразових пробірках (Sarstedt, Germany) в термостаті при температурі 37° С. Для встановлення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту в опромінених лімфоцитах культуральна суміш складається з: 5,0 мл живильного середовища RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA) + 0, 1 мл фітогемаглютиніну (Sigma, USA) + 0,5 мл цільної опроміненої *in vitro* крові. Для встановлення ефекту свідка культуральна суміш складається з: 5,0 мл живильного середовища RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA) + 0, 1 мл фітогемаглютиніну (Sigma, USA) + 0,3 мл цільної неопроміненої крові + 0,3 мл цільної опроміненої (*in vitro*) крові від особи іншої статі. Змішану культуру лімфоцитів інкубують протягом 48-ми годин (перший мітоз).

Для зупинки поділу лімфоцитів на стадії метафази використовують колцемід, 0,1 мл якого додають в культуру за 3 години до фіксації. Для гіпотонічної обробки клітин до культуральної суміші додають 5 мл 0,55 % хлориду калію (37° С – 20 хвилин). Клітинний осад фіксують охолодженою сумішшю 96 % етанолу та крижаної оцтової кислоти (3 : 1) з триразовою зміною фіксатора. Для приготування препаратів хромосом 3 – 4 краплі клітинної суспензії наносять на знежирене, вологе скло, яке підсушують на термостолику (45°С). Приготовані препарати хромосом витримують в термостаті при температурі 56°С протягом 24 годин і фарбують з використанням диференційного G-забарвлення хромосом. Для цього препарати оброблюють 0,125 % трипсином – 5–8 секунд, споліскують у 0,9 % хлориді натрію і в натрієво-калієвому фосфатному буфері (рН 7,2) та фарбують 3 % розчином барвника Гімза протягом 10-ти хвилин.

Аналіз диференційно G-забарвлених препаратів проводять з індивідуальним каріотипуванням хромосом під мікроскопом зі збільшенням x1000. Аналізують не менше 100 метафаз, що відповідає встановленим вимогам. Враховують всі аберації хроматидного та хромосомного типів – хроматидні розриви і обміни, делеції, транслокації, інверсії, поліцентричні та кільцеві хромосоми. Встановлюють частоти абераційних клітин (в %) та рівень хромосомних аберацій (на 100 метафаз), порівнюють їх з контрольними показниками. Вірогідність різниці між отриманими даними проводять з використанням t-критерію Ст'юдента. Достовірне підвищення в опромінених лімфоцитах частоти аберацій хромосомного типу є показником дії радіації і свідчить про радіочутливість обстежених. Підвищення частоти аберацій хроматидного типу в неопромінених лімфоцитах, що культивувались в змішаних культурах з опроміненими клітинами, вказує на зростання хромосомної нестабільності, індукованої ефектом свідка.

Вказаний спосіб використаний нами для визначення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту і рівня хромосомної нестабільності внаслідок ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові осіб віком від 12 до 102 років. У результаті досліджень виявлено підвищену хромосомну нестабільність організму людини у 60–70-річному віці. В неопромінених лімфоцитах

периферичної крові (клітинах-свідках) підлітків, осіб середнього і літнього віку, що культивувались в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, зареєстровано зростання частоти аберацій хроматидного типу внаслідок індукції ефекту свідка.

Таким чином, отримані дані свідчать, що запропонований нами спосіб паралельного визначення радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту і рівня хромосомної нестабільності внаслідок ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини може бути використаний для одержання даних щодо індивідуальної радіочутливості лімфоцитів периферичної крові людини та індукції в них хромосомної нестабільності, що є важливим для прогнозування медичних наслідків дії іонізуючого випромінювання на організм людини.

За додатковою інформацією звертатися до авторів листа, тел.. (044) 278-54-15, e-mail: pww@ukr.net