



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61604 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ ЧАСТОТИ СПОНТАННИХ ТА РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ В СОМАТИЧНИХ НЕМАЛІГНІЗОВАНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u201015561

(22) 23.12.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ, ДЬОМІНА
ЕМІЛІЯ АНАТОЛІЙВНА, ДЕМЧЕНКО ОЛЕНА МИ-
КОЛАЇВНА(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬ-
КОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб зниження частоти спонтанних та радіаційно-індукованих генетичних пошкоджень в соматичних немалігнізованих клітинах людини, який відрізняється тим, що за дії малих доз іонізуючої радіації для забезпечення зменшення рівня хромосомних пошкоджень до значень спонтанного використовують антимуаген і радіопротектор інозин у профілактичній дозі.

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, зокрема до первинної профілактики радіаційно-індукованих пухлин, променевої терапії онкологічних хворих.

Рівень техніки. Іонізуючу радіацію відносять до повних канцерогенів, оскільки вона здатна реалізовувати свій непластичний потенціал на всіх етапах патологічного процесу, а індукована під її впливом дестабілізація геному людини лежить в основі розвитку радіогенних пухлин [1,2]. Тому захист нормальних органів і тканин від дії радіаційного фактору Чорнобильської катастрофи з метою подолання її медико-біологічних наслідків залишається актуальною проблемою клінічної радіобіології та радіаційної медицини [3].

Незважаючи на новітні програми і технології сучасної радіаційної онкології, лікування онкологічних хворих у ряді випадків призводить до тяжких пошкоджень нормальних органів і тканин, які попадають в зону опромінення, що не дозволяє довести курс променевої терапії до кінця. Використання класичних радіопротекторів для переважного захисту здорових радіочутливих тканин у процесі терапевтичного опромінення не призвело до очікуваних результатів із-за їх недоліків: високої токсичності і неефективності при фракціонованих режимах [4].

Згідно з сучасними уявленнями, накопичення генетичних пошкоджень в клітинній популяції вважається потенційно онкогенним [5], а малі дози іонізуючої радіації визнані канцерогенно небезпечними [6]. Оскільки розвиток стохастичних ефектів радіації, в т.ч. злослих новоутворень, реалізується через накопичення соматичних мутацій, то

рівень і спектр радіаційно-індукованих аберацій хромосом у найбільш радіочутливих соматичних клітинах людини - лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) - відповідно до рекомендацій ВООЗ, МАРАТЕ і НКДАР ООН вважається інформативним біоіндикатором опромінення [7].

Враховуючи вищезазначене, а також практичну неминучість мутагенного впливу на організм людини факторів довкілля, особливо важливого значення набуває пошук і використання активних речовин, що здатні мінімізувати радіаційно-індуковані ефекти шляхом підвищення стійкості генетичного апарата та активізації захисних систем організму людини. Основними вимогами до сучасних радіопротекторів залишаються: висока ефективність, нетоксичність, тривалість прояву радіозахисної дії, незалежно від виду іонізуючого випромінювання.

Суть корисної моделі, що заявляється. В основу корисної моделі поставлено задачу: зниження рівня індукованих генетичних пошкоджень в соматичних немалігнізованих клітинах людини за дії малих доз γ -опромінення. Поставлена задача вирішується тим, що як радіопротектор застосовується препарат інозин (рибоксин) - речовина природного походження, відомий як попередник синтезу АТФ і нуклеотидів та підтримуючий енергетичний баланс в різних тканин, який в профілактичній дозі (з перерахунку 0,01 мг/мл крові) вводиться попередньо до опромінення в організм людини.

Методика культивування ЛПК, приготування цитогенетичних препаратів та метафазний аналіз аберацій хромосом не відрізняється від загально-

(19) UA (11) 61604 (13) U

прийнятої [8]. При цьому аналіз аберацій хромосом здійснюється в метафазах першого мітозу після опромінення, тобто на 50 год. від початку інкубації клітин. Вищезазначене обумовлене тим, що при фіксації клітин в більш пізні строки інкубації частина аберацій елімінує при мітотичному поділі, що неминуче відобразиться на вірогідності одержаних результатів. Інозин ("Дарниця", Україна) додавали в концентрації 0,01 мг/мл крові за 30 хв. до опромінення в G₀ стадії мітотичного циклу. Культуру ЛПК опромінювали на терапевтичній γ-установці "Рокус" з джерелом ⁶⁰Co в діапазоні доз 0,1-1,0 Гр (потужність дози 0,89 Гр/хв., сила струму 10 МА, напруга 180 кВ).

Встановлено, що інозин не спричинює токсичного впливу на проліферативний потенціал ЛПК, що дозволило отримати достатню кількість метафазних пластинок для об'єктивного цитогенетичного аналізу (200-300 метафаз на кожне спостереження).

Інозин вносять до γ-опромінення в культуру ЛПК умовно здорових осіб (донори) та онкологічних хворих (злоякісні пухлини молочної залози,

тіла матки) на весь строк інкубації клітин. При введенні інозину в культуру неопромінених клітин клінічно здорових осіб (фіг. 1) та онкологічних хворих (фіг. 2) до початку протипухлинної терапії знижувалась загальна частота аберацій хромосом, аберацій хромосомного та хроматидного типів.

В умовно здорових осіб (донорів) спонтанний рівень загальної частоти аберацій хромосом становить - 1,6/100 клітин, а за дії інозину - 0,6/100 клітин, тобто спостерігається зниження частоти спонтанних аберацій хромосом у 2,6 рази. Під впливом інозину рівень аберацій хроматидного типу знижується у 1,7 рази, а аберації хромосомного типу „зникають” (табл. 1).

Введення інозину у культуру ЛПК онкологічних хворих знижує загальну частоту аберацій хромосом у 1,8 рази: частота аберацій хромосомного типу знижується у 1,7 разів, хроматидного типу - у 1,8 рази. Таким чином, під впливом інозину рівень генетичних пошкоджень знижується майже у 2 рази (табл. 2).

Таблиця 1

Дослідження модифікуючого впливу інозину на спонтанний рівень аберацій хромосом в ЛПК умовно здорових донорів (середньогрупові значення)

№ п/п	Цитогенетичний показник	Частота аберацій хромосом на 100 метафаз	
1	Загальна частота аберацій хромосом	1,6±0,2	p≤0,05
2	Загальна частота аберацій хромосом при додатковому введенні інозину	0,6±0,2	
3	Частота аберацій хромосомного типу	0,6±0,2	p≤0,05
4	Частота аберацій хромосомного типу при додатковому введенні інозину	0	
5	Частота аберацій хроматидного типу	1,0±0	p≤0,05
6	Частота аберацій хроматидного типу при додатковому введенні інозину	0,6±0,2	

Таблиця 2

Дослідження модифікуючого впливу інозину на спонтанний рівень аберацій хромосом в ЛПК онкологічних хворих (середньогрупові значення)

№ п/п	Цитогенетичний показник	Частота аберацій хромосом /100 метафаз	
1	Загальна частота аберацій хромосом	7,6±0,4	p≤0,05
2	Загальна частота аберацій хромосом при додатковому введенні інозину	4,3±0,2	
3	Частота аберацій хромосомного типу	2,5±0,3	p≤0,05
4	Частота аберацій хромосомного типу при додатковому введенні інозину	1,5±0,2	
5	Частота аберацій хроматидного типу	5,1±0,3	p≤0,05
6	Частота аберацій хроматидного типу при додатковому введенні інозину	2,8±0,4	

Аналіз одержаних цитогенетичних даних свідчить, що інозин знижує спонтанний рівень аберацій хромосом у неопромінених лімфоцитах периферичної крові, як умовно здорових донорів, так і онкологічних хворих, діючи на клітини в якості антимуагену.

Як видно із фіг. 3, введення інозину в культуру ЛПК умовно здорових осіб до γ-опромінення знижує частоту радіаційно-індукованих аберацій хромосом у всьому досліджуваному діапазоні доз.

Найбільший радіозахисний ефект інозину спостерігався при опроміненні культури клітин у діа-

пазоні малих доз - 0,1-0,2-0,3 Гр. Так, рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом знижувався з $6,06 \pm 0,6$; $7,06 \pm 1,6$; $7,76 \pm 1,0$ до $1,6 \pm 0,1$; $2,6 \pm 0,4$; $2,2 \pm 0,6$ на 100 клітин, відповідно,

досягаючи, таким чином, значень середньопопуляційного спонтанного рівня генетичних пошкоджень у ЛПК людини (табл. 3).

Таблиця 3

Модифікація радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів у ЛПК умовно здорових осіб під впливом інозину (середньогрупові значення)

Доза, Гр	Цитогенетичні показники (на 100 проаналізованих метафаз)					
	Частота абераційних метафаз, %	Загальна частота аберацій хромосом	Аберації хромосомного типу	Дицентрики	Аберації хроматидного типу	Делеції
0,1	$6,06 \pm 0,6$	$6,06 \pm 0,6$	2,99	0,3	3,07	3,0
Ін+0,1	$1,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	1,06	0,2	0,6	0,6
0,2	$7,0 \pm 1,6$	$7,06 \pm 1,6$	3,26	0,5	3,8	3,6
Ін+0,2	$2,6 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$	1,6	0,5	1,1	0,75
0,3	$7,5 \pm 1,0$	$7,76 \pm 1,0$	4,16	0,9	3,6	3,4
Ін+0,3	$2,2 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,6$	1,2	0,2	1,0	0,8
0,5	$10,9 \pm 1,4$	$11,3 \pm 1,4$	5,23	1,3	5,9	5,6
Ін+0,5	$3,5 \pm 1,0$	$4,5 \pm 1,0$	3,5	1,5	1,0	0,5
1,0	$17,4 \pm 1,5$	$18,6 \pm 1,8$	11,4	5,4	7,2	6,8
Ін+1,0	$14,8 \pm 1,1$	$15,5 \pm 1,0$	8,6	4,2	6,7	6,0

Примітка: Ін - інозин.

Коефіцієнт модифікації променевого ефекту дорівнював 3,8-2,7-3,5 відповідно. З подальшим підвищенням дози опромінення до 1,0 Гр радіозахисний ефект інозину знижувався, відповідно до чого коефіцієнт модифікації становив 1,2. Під впливом інозину знижувалась частота всіх цитогенетичних показників, в т.ч. промєневих маркерів - дицентричних хромосом (фіг. 4).

Аналогічний радіозахисний ефект інозину спостерігався при опроміненні культури ЛПК онкологічних хворих (табл. 4). В діапазоні малих доз 0,1-0,2-0,5 Гр рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом знижувався і коефіцієнт модифікації у індукованого ефекту становив 1,9; 1,7 та 2,2 відповідно.

Таблиця 4

Модифікація радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів у ЛПК онкологічних хворих під впливом інозину (середньогрупові значення)

Доза, Гр	Цитогенетичні показники (на 100 проаналізованих метафаз)					
	Частота абераційних метафаз, %	Загальна частота аберацій хромосом	Аберації хромосомного типу	Дицентрики	Аберації хроматидного типу	Делеції
0,1	$8,2 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,6$	2,4	0,8	5,8	5,0
Ін+0,1	$4,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	1,0	0	3,0	3,0
0,2	$8,7 \pm 1,5$	$8,7 \pm 1,5$	3,1	0,6	5,6	4,3
Ін+0,2	$5,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,0$	1,0	0	4,0	3,0
0,5	$10,0 \pm 1,4$	$10,0 \pm 1,4$	2,9	1,0	7,1	5,7
Ін+0,5	$4,6 \pm 1,0$	$4,6 \pm 1,0$	1,5	0	3,1	3,1

Примітка: Ін - інозин.

Таким чином, інозин проявляє антимуагенний та радіозахисний ефект при опроміненні соматичних немалігнізованих клітин людини в інтервалі малих доз (0,1-0,5 Гр) у вигляді зниження рівня радіаційно-індукованих генетичних пошкоджень до значень спонтанного.

Отже, використання препарату інозин в якості профілактичного радіопротектора доцільно реко-

мендувати особам, що працюють у сфері дії іонізуючої радіації (працівники атомних підприємств, рентгенологи, радіологи та ін.), мешканцям районів, які забруднені радіонуклідами внаслідок Чорнобильської катастрофи, з метою первинної профілактики розвитку злоякісних новоутворень радіаційного генезу. Використання інозину також доцільно призначати онкологічним хворим з метою

зниження ступеню і частоти променевих реакцій та ускладнень з боку здорових тканин внаслідок променевої терапії, що буде сприяти проведенню курсу терапевтичного опромінення в повному обсязі.

Приклади практичного застосування корисної моделі

Приклад 1. В ЛПК умовно здорових осіб (донорів) за умови дії інозину при γ -опроміненні в дозі 0,2 Гр частота аберацій хромосом знижувалась: для донора № 1 - з $3,2 \pm 0,4$ до $1,7 \pm 0,1$ на 100 проаналізованих метафаз; для донора № 2 - з $2,5 \pm 0,2$ до $1,8 \pm 0,1/100$ метафаз; для донора № 3 - з $8,1 \pm 1,3$ до $2,9 \pm 0,2/100$ метафаз відповідно; а при дозі γ -опромінення 0,5 Гр частота аберацій хромосом знижувалась: для донора № 1 - з $7,0 \pm 1,2$ до $3,5 \pm 0,3/100$ метафаз; для донора № 2 - з $10,0 \pm 1,5$ до $3,0 \pm 0,4/100$ метафаз; для донора № 3 - з $10,0 \pm 1,5$ до $3,2 \pm 0,2/100$ метафаз відповідно.

Приклад 2. В ЛПК онкологічної хворої до початку протипухлинної терапії (фіг. 5; № 2) частота аберацій хромосом до дії інозину становить 9,0 на 100 проаналізованих метафаз, а під його впливом знижується до 5,0 на 100 метафаз; для онкологічної хворої (фіг. 5; № 5) - частота аберацій хромосом становила 6,0 і 3,0 на 100 клітин відповідно. При цьому зменшення частоти аберацій хромосом при введенні в культуру клітин інозину спостерігали за рахунок аберацій як хромосомного, так і хроматидного типів, але найбільше зниження частоти аберацій відбувалося за рахунок делецій.

Перелік фігур до заявки на корисну модель: "Спосіб зниження частоти спонтанних та радіаційно-індукованих генетичних пошкоджень в соматичних немалігнізованих клітинах людини"

Фіг. 1. Модифікуючий вплив інозину на спонтанний рівень аберацій хромосом в ЛПК умовно здорових донорів.

Позначення: 1 - загальна частота аберацій хромосом, 2 - частота аберацій хромосомного типу, 3 - частота аберацій хроматидного типу (середньогрупові значення).

Фіг. 2. Модифікуючий вплив інозину на спонтанний рівень аберацій хромосом в ЛПК онкологічних хворих.

Позначення: 1 - загальна частота аберацій хромосом, 2 - частота аберацій хромосомного ти-

пу, 3 - частота аберацій хроматидного типу (середньогрупові значення).

Фіг. 3. Модифікуючий вплив інозину на радіаційно-індуковану частоту аберацій хромосом.

Фіг. 4. Метафазна пластинка лімфоцита периферичної крові людини з променевим маркером - дицентричною хромосомою та парним фрагментом (вказано стрілками).

Фіг. 5. Індивідуальні значення частоти аберацій хромосом в ЛПК онкологічних хворих під впливом інозину.

Джерела інформації:

1. Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U. et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict cancer independently of exposure to carcinogens // Cancer Research.-2000. - Vol.60. - P.1619-1625.

2. Hagmar L., Stromberg U., Bonassi S. et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk // Cancer Res.-2004. - Vol.64. - P.2258-2263.

3. Легеза В. И., Антушевич А. Е., Пикалова Л. В., Жекалов А. Н. Отдаленные последствия у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС // Профилактическая медицина.-2008. - Т. 9. - С. 362-372.

4. Дьоміна Е. А., Іванкова В.С. Індивідуальна радіаційна чутливість пухлин та її цілеспрямована модифікація // Укр. радіологічний журнал.-2010. - № 2. - С. 175-178.

5. Sanberg A.A. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia // Mutat. Res.-1991. - Vol. 247, № 2. - P.231-240.

6. Dyomina E. Cytogenetic and cancerogenic effects of low dose // Eur. J. Human Genetics.-2007. - Vol. 15. - Suppl. 1. - P. 102-103.

7. Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Reports Series № 260. - Vienna: Int. Atom. Energy Agency, 1986.- 69p.

8. Снигирева Г. П., Богомазова А. Н., Новицкая Н. Н. и соавт. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов // Метод. рекомендации. - Санкт-Петербург, 2007.-32 с.



Фіг. 1



Fig. 2

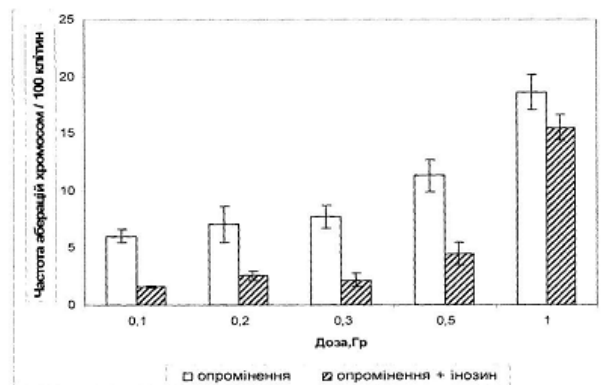


Fig. 3



Fig. 4

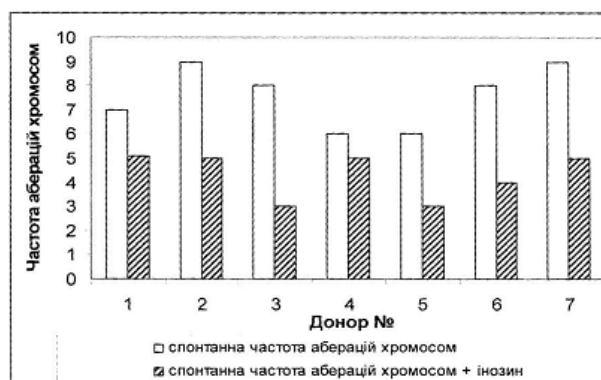


Fig. 5

