

зависимости «доза-эффект» для лучевых цитогенетических маркеров в отдаленные сроки (10 и более лет) у УЛП с онкологическими заболеваниями.

Установлена обратная зависимость частоты возникновения рака у УЛП от уровня радиационного воздействия: наибольшее значение отмечается в области действия малых доз

(3–10 сГр). С увеличением дозы облучения (до 85 сГр) частота злокачественных образований снижается.

Выводы. Разработан оптимальный комплекс цитогенетических критериев для формирования групп повышенного канцерогенного риска при обследовании пострадавших лиц в отдаленные постлучевые сроки.

НОВЫЙ СПОСОБ ВЕРИФИКАЦИИ МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАДИОГЕННОГО РАКА

Е.Н. ДЕМЧЕНКО, Е.А. ДЕМИНА

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г.Киев, Украина*

Согласно современным представлениям появление хромосомных aberrаций в клеточной популяции считается потенциально онкогенным, а малые дозы радиации – статистически значимым фактором развития радиогенного рака. С этих позиций особую актуальность приобретает корректная биологическая дозиметрия в области малых доз облучения.

С целью реконструкции поглощенных доз ионизирующего излучения уровень радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в «биологических» дозиметрах – лимфоцитах крови человека, сопоставляется со стандартными калибровочными кривыми (СКК), построенными по данным тестирующего облучения культуры клеток. В этой связи актуальным является получение корректных СКК, на основе которых осуществляется верификация интегральной дозы у облученных лиц. Недостатком традиционно используемых с этой целью линейной (ЛМ) и линейно-квадратичной (ЛКМ) моделей являются их значительные ошибки, в некоторых случаях несоответствие экспериментальных (цитогенетических), клинических и расчетных данных, а также, что является наиболее существенным, неучет индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ) донора, на лимфоцитах которого построены СКК. Вышеизложенное в отдельных случаях может обусловить необъективную оценку величины поглощенной дозы и, таким образом, ограничить возможности биологической дозиметрии.

В настоящем исследовании разработан новый способ реконструкции малых доз радиации по хромосомным aberrациям с использованием модели сплайновой регрессии и учетом ИРЧ, определяемой на основе цитогенетического G_2 -теста.

Модель сплайновой регрессии отличается от традиционно используемых в биодозиметрии ЛМ и ЛКМ более точной оценкой степени лучевого повреждения организма человека, в первую очередь, за счет ее меньшей ошибки. Ошибка определяется остаточной суммой квадратов по результатам сопоставления экспериментальных (цитогенетических) и расчетных данных, полученных на основе данной модели: чем меньше остаточная сумма квадратов, тем более точна модель. Например, ошибка предложенной модели сплайновой регрессии в диапазоне доз 0,1–1,0 Гр, для уровня aberrантных клеток в 6,8 раз ниже при сопоставлении с ошибкой ЛМ, и приблизительно в 8 раз – ЛКМ; для суммы aberrаций хромосом в 7,1 раза меньше по сравнению с ЛМ и в 7,8 – с ЛКМ. Относительно наиболее информативных лучевых дозиметров – дицентрических хромосом – показано, что по сравнению с ЛМ и ЛКМ дозовая зависимость этих показателей наилучшим образом аппроксимируется сплайновой регрессией (ее ошибка в 1,4 раза меньше по сравнению с другими моделями). Кроме того, меньшее значение ошибки данной модели предоставляет возможность уменьшить объем статистических данных – анализировать меньшее

количество клеток на одно наблюдение. Одновременно оценка ИРЧ донора, на лимфоцитах крови которого построены СКК для различных цитогенетических показателей (клеток с абберациями хромосом, суммы аббераций хромосом, дицентрических хромосом), предоставляет возможность получить СКК с учетом его генетических и физиологических особенностей.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ С ВЫСОКОЙ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТЬЮ (HRM) ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *TP53*

Е.В. ДЕНИСОВ, Н.В. ЛИТВЯКОВ, Е.М. СЛОНИМСКАЯ, Н.В. ЧЕРДЫНЦЕВА

НИИ онкологии СО РАМН, г.Томск

Анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью (High Resolution Melting, HRM) представляет собой простую и высокоэффективную технологию для выполнения задач генотипирования и скрининга мутаций. Данный метод имеет ряд преимуществ перед существующими аналогами, прежде всего выражающихся в высокой чувствительности/специфичности (до 100%) и возможности совмещения полимеразной реакции с самим этапом детекции мутаций. Принцип метода основан на дифференциации образцов ДНК, несущих потенциальные мутации, по форме или сдвигу кривых плавления (Montgomery J. et al., 2007).

В текущей работе HRM анализ был применен для скрининга мутаций в 8-м экзоне гена-онкосупрессора *TP53*. В качестве материала исследования использовали ДНК, выделенную из 11 клеточных линий с известным статусом гена *TP53* (wild type (wt) и мутации): A-172 (wt), A431 (C817T), BT-20 (wt), C33A (C817T), HCT-15 (wt), MDA-MB-231 (G839A), MDA-MB-435 (G797A), NCI-H23 (wt), OVCAR-3 (wt), SK-MEL-28 (wt), T47D (wt), а также образцы опухолевой ДНК от больных раком молочной железы (n=5), предварительно проанализированные на мутации *TP53* методом SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, анализ полиморфизма конформаций одноцепочечных

фрагментов). Праймеры к 8-му экзону были подобраны с расчетом отсутствия в их составе вторичных структур (димеров, палиндромов) и повторов. Анализ кривых плавления проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett Research). В качестве флуоресцентного красителя использовали EvaGreen (Biotium).

Таким образом, новый способ реконструкции дозы облучения по хромосомным абберациям с использованием модели сплайновой регрессии и одновременном учете ИР человека объективизирует степень лучевого поражения и может иметь значение при формировании групп повышенного риска развития радиогенного рака.

В результате проведенного анализа кривых плавления нами были подтверждены все *TP53* мутации, характерные для вышеуказанных клеточных линий. Из пяти образцов опухолевой ДНК больных раком молочной железы только в четырех случаях была подтверждена мутация гена *TP53*. Учитывая высокую детекционную способность HRM анализа, можно утверждать, что пятая проба была ошибочно отмечена в SSCP анализе (чувствительность 80-90%) как мутантная.

Таким образом, представленная в данной работе технология анализа кривых плавления с высокой степенью разрешения (HRM) является простым и высокочувствительным методом скрининга мутаций, использовать который можно и в клинической диагностике.

Авторы выражают огромную благодарность профессору Петру Михайловичу Чумакову (Научно-исследовательский институт Лернера, Кливленд, США) за предоставленные клеточные линии.