

(ЕЧС), *Pyrus communis* L. – ч. (ЕЧС), *Rosa canina* L. – ч., *Rosa rubiginosa* L. – р., *Rubus caesius* L. – звич., *Rubus idaeus* L. – звич., *Rubus nessensis* Hall. – р., *Sorbus aucuparia* L. – звич.

RUBIACEAE: *Cruciata glabra* (L.) Ehrend. – спор., *Galium aparine* L. – звич., *Galium album* Mill. – спор., *Galium odoratum* (L.) Scop., *Galium palustre* L. – спор., *Galium mollugo* L. – ч., *Galium uliginosum* L. – спор., *Galium verum* L. – звич.

RUTACEAE: *Ptelea trifoliata* L. – р.

SALICACEAE: *Populus tremula* L. – звич., *Populus nigra* L. – ч. (МСОП), *Salix alba* L. – спор., *Salix cinerea* L. – звич., *Salix caprea* L. – ч., *Salix fragilis* L. – ч., *Salix triandra* L. – ч.

SANTALACEAE: *Viscum album* L. – спор.

SCROPHULARIACEAE: *Digitalis grandiflora* Mill. – р., *Linaria vulgaris* Mill. – ч., *Melampyrum nemorosum* L. – ч., *Scrophularia nodosa* L. – спор., *Verbascum lychnitis* L. – спор., *Verbascum nigrum* L. – р., *Verbascum phlomoides* L. – спор.

SAXIFRAGACEAE: *Chrysosplenium alternifolium* L. – р.

SOLANACEAE: *Datura stramonium* L. var. *tatula* – р., *Solanum dulcamara* L. – спор., *Solanum nigrum* L. – ч.

ULMACEAE: *Ulmus glabra* Huds. – ч., *Ulmus laevis* Pall. – р., *Ulmus minor* Mill. – р.

URTICACEAE: *Urtica dioica* L. – ч. (ЕЧС), *Urtica galeopsifolia* J. Jacq. ex Blume – р.

VALERIANACEAE: *Valeriana officinalis* L. – спор.

VIOLACEAE: *Viola arvensis* Murray – ч., *Viola canina* L. – спор., *Viola hirta* L. – р., *Viola mirabilis* L. – р., *Viola odorata* L. – спор., *Viola tricolor* L. – ч.

VITACEAE: *Parthenocissus incerta* (A.Kern.) Fritsch – спор., *Vitis vinifera* L. – р.

Умовні позначення та скорочення: Частота трапляння: ч. – часто, звич. – звичайно, спор. – спорадично, р. – рідко, поод. – поодинокі. Природоохоронний статус: МСОП – Червоний список МСОП, ЕЧС – Європейський червоний список, ЧКУ – Червона книга України, БК – Додаток Бернської конвенції, ЧСКО – список регіонально рідкісних рослин Київської області.

Symbols and abbreviations. Frequency of occurrence: ч. – often, звич. – of course, спор. – sporadically, р. – rarely, поод. – singly. Conservation status: IUCN – IUCN Red List, ЕЧС – European Red List, ЧКУ – Red Book of Ukraine, БК – Annex to the Bern Convention, ЧСКО – list of regionally rare plants of Kyiv region.

УДК 575.113.001.8-001.73:612.112:616.15:575.224.4
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.55-61

М. Романенко, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Д. Курінний, канд. біол. наук,

О. Демченко, канд. біол. наук,

С. Клименко, д-р мед. наук

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ, Україна,

С. Рушковський, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ *IN VITRO* НА ГЕНОМ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРІФЕРИЧНОЇ КРОВІ БЕЗСИМПТОМНИХ НОСІЇВ МУТАЦІЇ 5382insC У ГЕНІ *BRCA1*

Одним зі спадкових чинників, що впливає на розвиток раку молочної залози та яєчників, є точкова мутація 5382insC гена *BRCA1*. Однак приблизно у 15 % носіїв цієї мутації протягом життя онкологічна симптоматика не виявляється. Нині особливості розвитку спонтанної та індукованої геномної нестабільності у безсимптомних носіїв мутації в гені *BRCA1* вивчені недостатньо. Метою роботи було оцінити вплив мутації 5382insC у гені *BRCA1* на радіочутливість лімфоцитів у осіб без реалізованої онкопатології. Було проведено культивування лімфоцитів крові дев'яти жінок (трьох осіб із мутацією 5382insC *BRCA1* без реалізованої онкопатології та шести умовно здорових волонтерів). Частина зразків була опромінена γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 1,0 Гр перед початком культивування. За допомогою методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) у нейтральних умовах було здійснено оцінювання відносного рівня пошкодження ДНК. Установлено, що спонтанний рівень пошкодження ДНК у культурах лімфоцитів у носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* перевищував показники групи контролю ($p < 0,01$). Після впливу іонізуючого випромінювання в культурах лімфоцитів осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* зазначено зменшення ($p < 0,01$) кількості клітин із високим рівнем пошкодження ДНК на тлі статистичного зростання ($p < 0,01$) апоптичної активності в культурі. Зроблено припущення, що посилення елімінації клітин із високим рівнем пошкодження ДНК через зростання апоптичної активності у відповідь на дію пошкоджуючих геном факторів є одним із ефективних механізмів, що може суттєво знижувати ймовірність виникнення онкологічних захворювань у безсимптомних носіїв мутації гена *BRCA1*.

Ключові слова: ген *BRCA1*, Comet assay, апоптоз, лімфоцити периферичної крові, опромінення, пошкодження ДНК.

Вступ. Рак молочної залози та яєчників є найбільш поширеним пухлинним захворюванням серед жінок у світі. Щодня фіксується близько 3,5 тис. нових випадків. Близько 69 % від загальної кількості хворих реєструються в нерозвинутих країнах, де більшість випадків хвороби діагностуються на пізніх стадіях. Згідно зі статистикою, кожна восьма жінка ризикує захворіти на один із цих типів раку [1–5].

На сьогодні є відомими як середовищні, так і спадкові чинники, що впливають на розвиток раку молочної

залози та яєчників. До основних середовищних факторів можна віднести замісну терапію естрогеном, паління використання внутрішньоматкової спіралі синдром полікістозних яєчників, тривале приймання препаратів для лікування безпліддя [5]. Найважливішими генетичними чинниками є генеративні мутації генів *BRCA1* або *BRCA2*, які обумовлюють спадкові форми раку молочної залози та яєчників [6–8].

Успадкованими точковими мутаціями 5382insC, 185delAG, 300T>G та 4153delA в гені *BRCA1* обумовле-

ний приблизно кожен двадцятий випадок раку молочної залози та яєчників. Мутаційні зміни в гені *BRCA1* призводять до значного підвищення ризику розвитку первинних раків молочної залози та яєчників у когорті осіб-носіїв (до 80 і 69 %, відповідно). Після діагностування інвазивного раку молочної залози ці жінки мають високий ризик розвитку повторного іпсилатерального або контралатерального раку молочної залози.

Гени *BRCA1* та *BRCA2* задіяні у процесі репарації дволанцюгових розривів ДНК за типом гомологічної рекомбінації (HR), яка пригнічується при порушенні експресії цих генів у результаті мутацій або епігенетичних змін [9, 10]. Інші шляхи репарації (BER, NER, NHEJ) не можуть повністю компенсувати відсутність гомологічної репарації, що призводить до накопичення із часом репараційних помилок, наслідком чого є значне підвищення ризику виникнення злоякісних новоутворень молочної та підшлункової залоз, простати, яєчників [11, 12]. Крім того, генетичні чи епігенетичні зміни гена *BRCA1* призводять до порушення регуляції клітинного циклу та нормальної сегрегації хромосом у мітозі [13].

Таким чином, розвиток онкологічних патологій у носіїв мутацій у гені *BRCA1* є чітко асоційованим із високим рівнем геномної нестабільності, якій критично збільшується за наявності мутагенного навантаження. Однак приблизно у 15 % носіїв протягом життя онкологічна симптоматика не виявляється.

На сьогодні особливості розвитку спонтанної та індукованої геномної нестабільності у безсимптомних носіїв мутацій у гені *BRCA1* вивчені недостатньо.

Мета роботи: оцінити вплив мутації 5382insC у гені *BRCA1* на радіочутливість лімфоцитів у осіб без реалізованої онкопатології.

Матеріали та методи. Було проведено культивування лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) дев'яти жінок: трьох осіб із мутацією 5382insC *BRCA1* без реалізованої онкопатології віком від 47 до 52 років, у середньому 51 рік (експериментальна група), і шести умовно здорових волонтерів віком від 36 до 51, у середньому 47 років (група порівняння). У всіх випадках

наявність мутації було верифіковано з використанням полімеразно-ланцюгової реакції.

Загальний обсяг досліджень включав аналіз 14400 клітин, із яких 8400 – лімфоцити умовно здорових волонтерів, 6000 – клітини осіб-носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1*. Особи з обох груп брали добровільну участь в обстеженнях після підписання інформованої згоди.

Культивування ЛПК проводили відповідно до стандартного протоколу впродовж 48 год. Частину культур опромінювали γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 1,0 Гр перед початком інкубації клітин.

Оцінювання відносного рівня пошкоджень ДНК проводили за допомогою методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) у нейтральних умовах.

Для приготування слайдів, лізису клітин і проведення нейтрального кометного електрофорезу використовували загальноприйнятну методику [14, 15]. Виділення лімфоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) проводили згідно із протоколом виробника. Отриману суспензію клітин змішували з 1 %-ю легкоплавкою агарозою (Sigma, USA) при 37 °C. Після лізису скельця відмивали у буфері TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 7,5), після чого проводили електрофорез у TBE-буфері 15 хв за температури 4 °C, напруги 1 В/см і сили струму у 200 mA.

Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) та аналізували під люмінесцентним мікроскопом, до якого приєднували фотоапарат "Canon D1000". Зображення обробляли за допомогою програми "ImageJ" (imagej.nih.gov) із використанням плагіну "Open Comet" [16]. Як основний параметр для визначення відносного рівня пошкодження ДНК застосовували показник Tail Moment (TM), який одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині "комети", так і довжину хвостової частини [15]. Атипові "комети" (рис. 1 Б), які утворюються із клітин, що перебувають у стані апоптозу [17], ураховували окремо. Частоту атипових "комет" використовували для оцінювання інтенсивності процесів апоптозу у клітинній культурі.



Рис. 1. "Комети", що утворюються внаслідок міграції ДНК у агарозний гель:
А – типові "комети"; Б – атипові "комети"

Статистичну обробку даних проводили стандартними методами. Достовірність різниці між рядами даних значень TM розраховували за критерієм Мана – Вітні [18].

Результати та їх обговорення. Індивідуальні фонові значення TM у культурах ЛПК волонтерів із групи порівняння коливались у межах $3,47 \pm 0,68$ – $6,46 \pm 0,27$, а індивідуальні середні значення TM трьох

осіб носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* були $15,52 \pm 1,16$, $18,51 \pm 1,98$ та $26,19 \pm 1,71$. При попарному порівнянні індивідуальних рядів даних різниці між ними не досягали достовірного рівня значущості ($p > 0,05$) ні у групі порівняння, ні у групі осіб-носіїв, тому в подальших розрахунках для кожної групи ми використовували об'єднаний пул "комет".

Розподіли значень параметра ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб із обох груп представлені на рис. 2.

В осіб із групи порівняння фоновий рівень показника ТМ після 48-годинного культивування ЛПК у середньому становив $4,26 \pm 0,30$, що збігається з результатами наших попередніх досліджень [19, 20].

При аналізі фонових рівнів ТМ у культурах ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* було зазна-

чено статистично значуще зростання ($p < 0,001$) значення показника порівняно з даними групи контролю ($19,83 \pm 1,72$ по групі в середньому). Отриманий результат указує на наявність високої частоти нерепарованих одно- та дволанцюгових розривів ДНК у ЛПК осіб цієї групи.

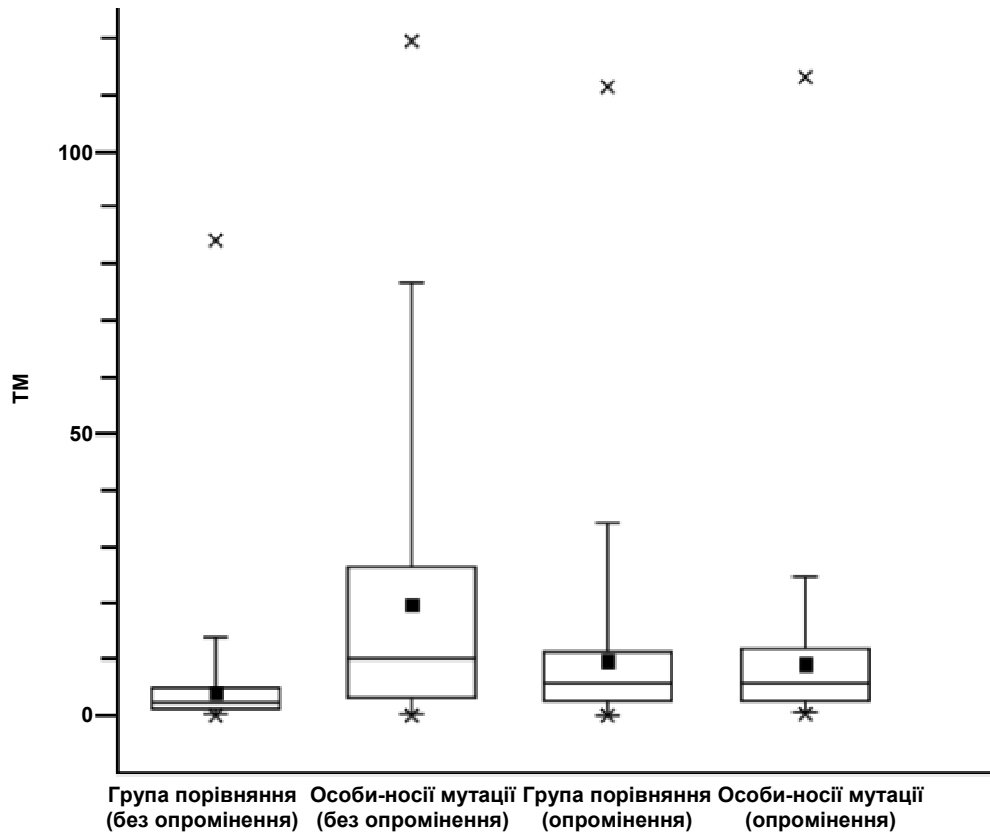


Рис. 2. Діаграма розмаху значень ТМ у осіб із групи порівняння та осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*. Нижня та верхня сторони коробу відповідають першому та третьому квартилям, лінія у середині коробу – медіані. Границі "вусів" показують, у які межі попадають 90 % значень ТМ (з 5-го по 95-й процентиль); ■ – середнє значення ТМ, × – мінімальне та максимальні значення ТМ однина чи множина?

Опромінення *in vitro* культур лімфоцитів спричинило різноспрямовану реакцію: у культурах ЛПК групи порівняння було зафіксовано очікуване зростання ТМ (середній показник по групі становив $12,86 \pm 0,74$), у той самий час у групі носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* дія іонізуючого випромінювання зумовила падіння середньогрупового значення ТМ із $19,83 \pm 1,72$ (до опромінення) до $9,11 \pm 0,85$ (після опромінення).

Для того щоб установити, із чим пов'язане зниження рівня ТМ у ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC *BRCA1*, зареєстроване під впливом опромінення, було проведено оцінювання частотного розподілу "комет". Усі "комети" були розподілені за значеннями ТМ на 17 груп (ТМ від 0 до 16+). Якщо ТМ дорівнював

граничному значенню, то "комету" відносили до наступної групи [19].

Аналіз розподілу "комет" при культивуванні неопромінених ЛПК осіб групи порівняння (рис. 3) показав переважання груп клітин із відносно низьким рівнем розривів ДНК (ТМ у межах від 0 до 5). Після опромінення спостерігався статистично значущий ($p < 0,01$) зсув розподілу "комет" у напрямку збільшення частот клітин із високими рівнями пошкодження ДНК. Так, частота "комет" останньої групи, які утворюються з клітин із найбільшим відносним рівнем пошкодження геному (ТМ 16+), зросла від $4,30 \pm 0,90$ % (культури неопромінених ЛПК) до $15,46 \pm 1,17$ % (культури ЛПК після опромінення), що узгоджується з нашими попередніми даними [19, 20].

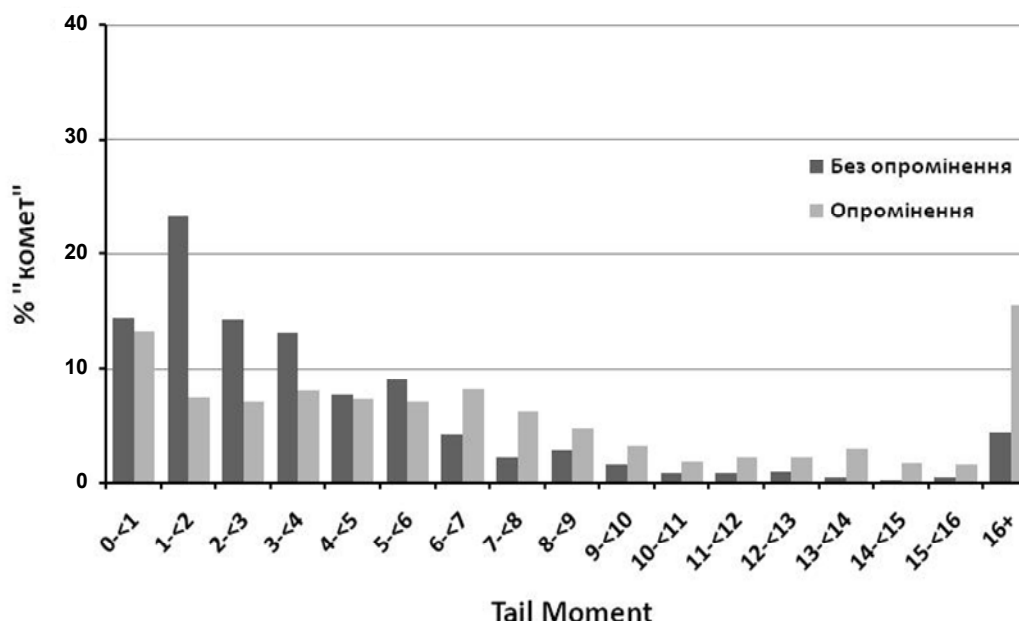


Рис. 3. Розподіли частот "комет" за значеннями ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб із групи порівняння

Як можна побачити з рис. 4, після культивування інтактних лімфоцитів безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* найбільша кількість "комет" належала до останньої групи ТМ 16+ ($38,74 \pm 3,52$ %). Саме з наявністю пулу клітин із високою спонтанною частотою розривів ДНК пов'язано значне збільшення середньогрупового рівня ТМ у культурах лімфоцитів експериментальної групи відносно відповідних показників групи порівняння. Таким чином, у осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* без реалізованої онкологічної патології спостерігається надзвичайно високий рівень геномної нестабільності навіть в умовах відсутності додаткового мутагенного навантаження.

Після впливу іонізуючого випромінювання на ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* було зазначено неочікуване статистично значуще падіння рівня

клітин із високим ступенем пошкодження геному: до $12,98 \pm 2,33$ %, $p < 0,001$ (рис. 4). Зважаючи на те, що радіаційне навантаження є потужним мутагенним фактором, а доза в 1,0 Гр призводить до виникнення 1000 одно- та 40 дволанцюгових розривів ДНК [21], слід було очікувати ще більшого домінування групи із ТМ > 16 за рахунок зменшення частоти клітин у групах із ТМ від 0 до 10.

Можливим поясненням отриманих результатів могло бути посилення елімінації клітин із сублетальним рівнем пошкодження ДНК через зростання апоптичної активності в культурі ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC *BRCA1* у відповідь на дію іонізуючого випромінювання. Для перевірки цього припущення було проведено аналіз частот атипових "комет", які утворюються із клітин, що перебувають у стані апоптозу [17, 19].

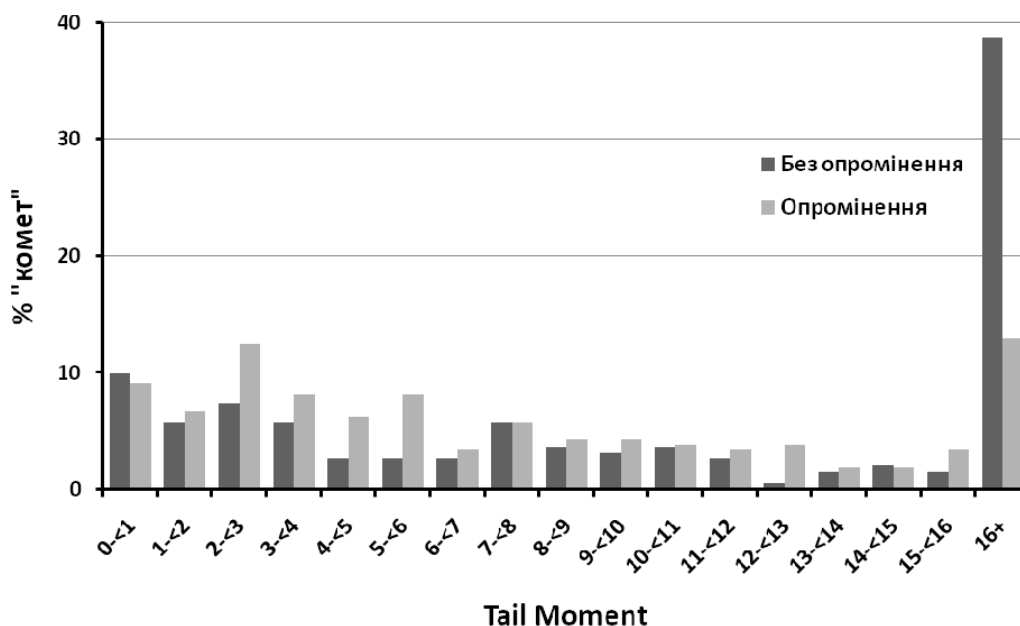


Рис. 4. Розподіли частот комет за значеннями ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*

У культурах ЛПК групи порівняння під впливом опромінення зафіксовано зростання середньої частоти атипичних "комет" із $1,15 \pm 1,00\%$ до $3,78 \pm 0,81\%$ ($p < 0,01$). Отриманий результат відповідає нашим попереднім даним [20, 21]. Середній рівень атипичних "комет" осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* дорівнював $5,95 \pm 1,49\%$ в інтактній культурі ЛПК і статисти-

стично значуще ($p < 0,01$) зростав (до $14,39 \pm 2,16\%$) після опромінення (рис. 5). Таким чином, спонтанна та індуквана дією іонізуючого випромінювання апоптична активність у культурах ЛПК безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* статистично значуще ($p < 0,01$) перевищувала відповідні показники групи порівняння.

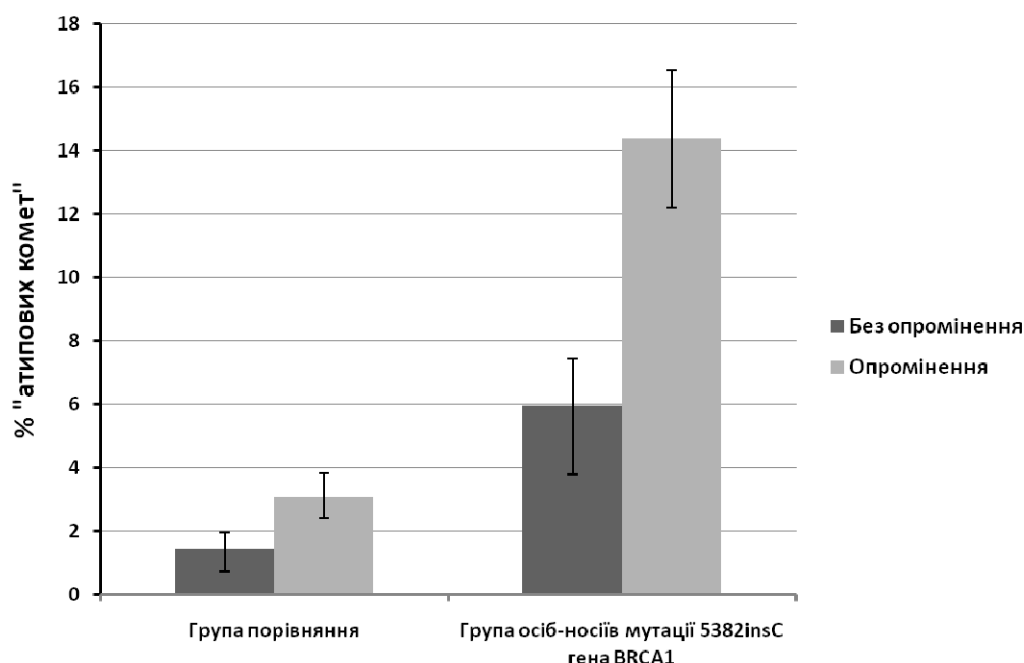


Рис. 5. Частота атипичних "комет" у інтактних та опроміненних культурах ЛПК осіб із групи порівняння та групи осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що рівень спонтанної геномної нестабільності в культурах ЛПК носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* статистично значуще ($p < 0,01$) перевищував відповідні показники групи порівняння. Цей результат демонструє негативні наслідки мутаційних змін у гені *BRCA1* для геному загалом – зростання із часом репараційних помилок у зв'язку із пригніченням HR-репарації дволанцюгових розривів ДНК. У той самий час нами було встановлено, що вплив зовнішніх мутагенних чинників на ЛПК осіб групи дослідження (особи з мутацією 5382insC у гені *BRCA1* з невиявленою онкопатологією) викликає значне посилення апоптичної активності та, як наслідок, елімінації клітин із високим рівнем пошкоджень геному.

Таким чином, одним із важливих та ефективних механізмів, який компенсує низьку ефективність репарації та суттєво знижує ймовірність виникнення онкологічних захворювань у осіб цієї групи, є апоптоз.

Висновки. За допомогою методу "Comet assay" нами було встановлено високий спонтанний рівень пошкодження ДНК у лімфоцитах периферичної крові безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*. У відповідь на дію іонізуючого випромінювання в культурах лімфоцитів осіб-носіїв зазначено суттєве падіння частоти клітин із високою кількістю розривів ДНК і статистично значуще зростання атипичних "комет", що може свідчити про збільшення апоптичної активності в культурі.

Список використаних джерел

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. International Classification of Diseases for Oncology. – 3rd edition. Accessed March 1, 2018. – URL : <http://codes.iarc.fr/>.
2. World Health Organization. International Classification of Diseases, 10th revision. Accessed March 1, 2018. – URL : <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.

3. Cancer in North America: 2010–2014. Volume One: Combined Cancer Incidence for the United States, Canada and North America / G. Copeland, A. Lake, R. Firth et al. // Springfield, IL : North American Association of Central Cancer Registries. – 2017. – Vol. .
4. Ovarian cancer statistics, 2018 / L. A. Torre, B. Trabert, C. E. de Santis et al. // CA : A Cancer Journal for Clinicians. – 2018. – Vol. 68. – P. 284–296.
5. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors / Z. Momenimovahed, A. Tiznobaik, S. Taheri et al. // International Journal of Women's Health. – 2019. – Vol. 11. – P. 287–299.
6. *BRCA 1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer / Fergus J. Couch, Michelle L. Deshano, M. Anne Blackwood et al. // New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336. – P. 1409–1415.
7. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi jews / Jeffery P. Struwing, Patricia Hartge, Sholom Wacholder et al. // The New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336. – P. 1401–1408.
8. *BRCA* germline mutation test for all woman with ovarian cancer? / A. V. Paradiso, M. Digennaro, M. Patruno et al. // BMC Cancer. – 2019. – Vol. 19. – P. 641–652.
9. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes / Olafur A. Stefansson, Sebastian Moran, Antonio Gomez et al. // Molecular Oncology. – 2015. – Vol. 9. – P. 555–568.
10. *BRCA1* and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells / P. Mita, X. Sun, D. Fenyö et al. // Nature Structural Molecular Biology. – 2020. – Vol. 27. – P. 179–191.
11. *Brca1* Controls Homology-Directed DNA Repair / Mary Ellen Moynahan, Joanne W. Chiu, Beverly H. Koller et al. // Molecular Cell. – 1999. – Vol. 4. – P. 511–518.
12. Tarsounas M. The antitumorigenic roles of *BRCA1*–*BARD1* in DNA repair and replication / Madalena Tarsounas, Patrick Sung // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2020. – Vol. 21. – P. 284–299.
13. Ashok R. Venkitaraman. Cancer Susceptibility and the Functions of *BRCA1* and *BRCA2* / Venkitaraman R. Ashok // Cell. – 2020. – Vol. 108. – P. 171–182.
14. Burlinson B. The *in vitro* and *in vivo* comet assays / B. Burlinson // Methods Molecular Biology. – 2012. – Vol. 817. – P. 143–163.
15. Azqueta A. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights / A. Azqueta, S. Langie, A. Collins // Frontiers. – 2007.
16. Open Comet: an automated tool for comet assay image analysis / Benjamin M. Gyori, Gireedhar Venkatachalam, P. S. Thiagarajan et al. // Redox Biology. – 2014. – Vol. 2. – P. 457–465.

17. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes *in vitro* / S. R. Rushkovsky, D. A. Kurinnyi, O. M. Demchenko et al. // *Ionizing radiation. Advances in research and applications*. – 2018. – Vol. 7. – P. 221–240.
18. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*, Eighth Edition / B. Rosner // Cengage Learning. – 2015. – P. 962.
19. Olive P. L. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P. L. Olive, J. P. Banáth // *Nat. Protoc.* – 2006 – Vol. 1. – P. 23–29.
20. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed *in vitro* on different stages of the mitotic cycle / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. // *Cytology and Genetics*. – 2018. – Vol. 1. – P. 40–45.
21. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation / D. Kurinnyi, S. Rushkovsky, O. Demchenko et al. // *Progress in Carotenoid Research*. – 2018. – Vol. 7. – P. 121–138.

References

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. International Classification of Diseases for Oncology, 3rd edition. Accessed March 1, 2018. URL: <http://codes.iarc.fr/>.
2. World Health Organization. International Classification of Diseases, 10th revision. Accessed March 1, 2018. URL: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
3. Copeland G, Lake A, Firth R. et al. *Cancer in North America: 2010–2014. Volume One: Combined Cancer Incidence for the United States, Canada and North America*. Springfield, IL: North American Association of Central Cancer Registries. 2017. June.
4. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE et al. Ovarian cancer statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018 Jul; 68(4): 284–296.
5. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S. et al. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*. 2019 Apr 30; 11: 287–299.
6. Fergus J. Couch, Michelle L. Deshano, M. Anne Blackwood et al. *BRCA 1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 1409–1415.
7. Jeffery P. Struwing, Patricia Hartge, Sholom Wacholder et al. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336(20): 1401–1408.
8. A. V. Paradiso, M. Digennaro, M. Patruno et al. *BRCA* germline mutation test for all woman with ovarian cancer? *BMC Cancer*. 2019; 19: 641–652.
9. Olafur A. Stefansson, Sebastian Moran, Antonio Gomez et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Molecular Oncology*. 2015; 9(3): 555–568.

10. Mita P., Sun X., Fenyö D. et al. *BRCA1* and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. *Nature Structural Molecular Biology*. 2020; 27: 179–191.
11. Mary Ellen Moynahan, Joanne W Chiu, Beverly H Koller et al. *BRCA1* Controls Homology-Directed DNA Repair. *Molecular Cell*. 1999; 4(4): 511–518.
12. Tarsounas, M., Sung, P. The antitumorigenic roles of *BRCA1*–*BARD1* in DNA repair and replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020; 21: 284–299.
13. Ashok R. Venkitaraman. Cancer Susceptibility and the Functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell*. 2002 Jan 25; 108(2): 171–182.
14. Burlinson B. The *in vitro* and *in vivo* comet assays. *Methods Molecular Biology*. 2012; 817: 143–163.
15. A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. *Frontiers*. 2007.
16. Benjamin M. Gyor, Gireedhar Venkatachalam, P.S. Thiagarajan et al. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol*. 2014 Jan 9; 2: 457–465.
17. S. R. Rushkovsky, D. A. Kurinnyi, O. M. Demchenko et al. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes *in vitro*. *Ionizing radiation. Advances in research and applications*. 2018; 221–240.
18. Rosner, B. *Fundamentals of Biostatistics*, Eighth Edition, Cengage Learning. 2015; 962.
19. D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed *in vitro* on different stages of the mitotic cycle. *Cytology and Genetics*. 2018; 52(1): 40 – 45.
20. Kurinnyi D., Rushkovsky S., Demchenko O. et al. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation. *Progress in Carotenoid Research*. 2018; 121–138.
21. Ahnström G., Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography, in *DNA Repair. A Laboratory Manual of Research Procedures*, eds Friedberg. 1981; 403–418.

Надійшла до редколегії 15.10.2020
Отримано виправлений варіант 16.11.2020
Підписано до друку 16.11.2020

Received in the editorial 15.10.2020
Received a revised version on 16.11.2020
Signed in the press on 16.11.2020

М. Романенко, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Д. Куринний, канд. биол. наук,
Е. Демченко, канд. биол. наук,
С. Клименко, д-р мед. наук
ГУ "Національний научний центр радіаційної медицини НАМН України",
Київ, Україна,
С. Рушковський, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ *IN VITRO* НА ГЕНОМ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИИ 5382insC В ГЕНЕ *BRCA1*

Одним из наследственных факторов, влияющих на развитие рака молочной железы и яичников, является точечная мутация 5382insC в гене *BRCA1*. Однако примерно у 15 % носителей этой мутации в течение жизни онкологическая симптоматика не проявляется. В настоящее время особенности развития спонтанной и индуцированной геномной нестабильности у бессимптомных носителей мутаций в гене *BRCA1* изучены недостаточно. Целью работы было оценить влияние мутации 5382insC в гене *BRCA1* на радиочувствительность лимфоцитов у лиц без реализованной онкопатологии.

Было проведено культивирование лимфоцитов крови девяти женщин (трех с мутацией 5382insC *BRCA1* без реализованной онкопатологии и шести условно здоровых добровольцев). Часть культур была облучена γ -квантами (излучатель IBL-237C, мощность 2,34 Гр / мин) в дозе 1,0 Гр перед началом культивирования. С помощью метода "Comet assay" в нейтральных условиях была проведена оценка относительного уровня повреждаемости ДНК.

Установлено, что спонтанный уровень повреждений ДНК в культурах лимфоцитов носителей мутации 5382insC в гене *BRCA1* превышал показатели группы контроля ($p < 0,01$). После воздействия ионизирующего излучения в культурах лимфоцитов лиц-носителей мутации 5382insC гена *BRCA1* было отмечено падение ($p < 0,01$) частоты клеток с высоким уровнем повреждений ДНК на фоне роста ($p < 0,01$) апоптотической активности. Сделано предположение, что увеличение элиминации клеток с высоким уровнем повреждений ДНК благодаря росту апоптотической активности в ответ на действие повреждающих геном факторов является одним из эффективных механизмов, который может существенно снижать вероятность возникновения онкологических заболеваний у бессимптомных носителей мутаций гена *BRCA1*.

Ключевые слова: ген *BRCA1*, Comet assay, апоптоз, лимфоциты периферической крови, облучение, повреждения ДНК.

M. Romanenko, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
D. Kurinnyi, PhD (Biol. Sci.),
O. Demchenko, PhD (Biol. Sci.),
S. Klymenko, Dr. Sci. (Med.)
National Scientific Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine,
S. Rushkovsky, PhD (Biol. Sci.)
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE IMPACT OF IONIZING IRRADIATION *IN VITRO* ON THE GENOME OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF THE ASYMPTOMATIC CARRIERS OF THE 5382insC MUTATION IN THE BRCA1 GENE

One of the hereditary factors affecting the development of breast and ovarian cancer is the 5382insC mutation in BRCA1 gene. But, nearly 15 % of carriers of this mutation do not manifest cancer during their lifetime. At present, the features of the development of spontaneous and induced genomic instability in asymptomatic carriers of BRCA1 mutations are studied insufficiently. The aim of the work was to evaluate the effect of the 5382insC BRCA1 mutation on the radiosensitivity of lymphocytes of individuals without an established oncopathology.

The cultivation of blood lymphocytes obtained from 9 women (3 individuals with the 5382insC BRCA1 mutation without established oncopathology, and 6 conditionally healthy volunteers) was carried out. Some of the cultures were irradiated with γ -quanta (IBL-237C emitter, power 2.34 Gy/min) at a dose of 1.0 Gy before cultivation. For evaluation of the relative level of DNA damage the method of Comet assay was applied.

It was found that spontaneous level of DNA damage in cultures of lymphocytes of carriers of the BRCA1 5382insC mutation was statistically significantly ($p < 0.01$) higher than in the control group. After exposure to ionizing radiation for lymphocyte cultures of individuals with BRCA1 5382insC mutation, a decrease ($p < 0.01$) in the level of cells with a high degree of DNA damage was observed while the apoptotic activity was found to be increased ($p < 0.01$). It has been suggested that an increase in the elimination of damaged cells due to apoptotic activity in response to the action of genome-damaging factors is one of the effective mechanisms that can significantly reduce the likelihood of cancer in asymptomatic carriers of the BRCA1 gene mutations.

Keywords: BRCA1 gene, Comet assay, apoptosis, peripheral blood lymphocytes, radiation, DNA damage.