



УДК 612.014.482:575.224.23.575.2

Э. А. Дёмина, В. С. Иванкова, Е. П. Пилипчук, Л. Б. Зеленая

Формирование хромосомной и микросателлитной нестабильности в клетках крови онкологических больных при комбинированном воздействии *in vitro* ионизирующей радиации и комутагенов

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В. Л. Ганулом)

Впервые изучены качественные и количественные закономерности формирования нестабильности генома в облученных соматических клетках онкологических больных под влиянием комутагена аскорбиновой кислоты. В зависимости от концентрации препарата комутагенные эффекты проявлялись в повышении частоты aberrаций хромосом в 1,4–1,7 раза за счет снижения эффективности системы репарации поврежденных. Полученные данные целесообразно учитывать в радиационной онкологии для контроля назначения больным препаратов с комутагенными свойствами, для предупреждения развития вторичных опухолей.

Ключевые слова: облучение, аскорбиновая кислота, радиационно-индуцированные aberrации хромосом, микросателлитная нестабильность, комутагенные эффекты, лимфоциты периферической крови онкогинекологических больных.

Прогрессия канцерогенеза предполагает дополнительные мутационные события в клетках и формирование более злокачественного фенотипа, что способствует метастазированию процесса [1]. При этом различают микросателлитную нестабильность (МН), связанную с нарушением процессов репарации двунитевых разрывов ДНК-гомологичной рекомбинации (homologous recombination (HR)), и хромосомную нестабильность (ХН) вследствие накопления aberrаций хромосом [2, 3]. Такие события могут развиваться также и после терапевтического облучения онкологических больных.

С другой стороны, описаны эффекты комутагенов, которые, не проявляя мутагенной активности, могут существенно усиливать эффекты химических мутагенов [4]. Существует предположение, что комутагенные эффекты опосредованы несколькими механизмами, но при этом вопрос относительно участия репарационных процессов в формировании этих эффектов остается открытым. Такое состояние проблемы комутагенеза отчасти

© Э. А. Дёмина, В. С. Иванкова, Е. П. Пилипчук, Л. Б. Зеленая, 2015

можно объяснить тем, что, не обладая собственной мутагенной активностью, препараты с комутагенными свойствами не выявляются при генотоксическом скрининге, но способны, как указывалось выше, существенно потенцировать влияние заведомо известных мутагенов. Недавно нами установлено, что воздействие комутагена верапамила может потенцировать радиационно-индуцированные эффекты в соматических клетках условно здоровых лиц [5]. Отдельный интерес представляет антиоксидант аскорбиновая кислота (АК), которая относится к наиболее распространенным в медицинской практике препаратам-антиоксидантам и обозначен “сигнальной молекулой, вызывающей специфическую активность в клетках” [6]. В настоящее время существует неопределенность в оценке характера (радио-защитного и/или комутагенного) воздействия АК на геном соматических клеток здоровых лиц и онкологических больных, подвергающихся локальному терапевтическому облучению.

Цель исследования состояла в изучении характера влияния АК на формирование нестабильности генома соматических клеток онкологических больных при рентгеновском облучении (исследование *in vitro*).

Материалы и методы. Материал исследования — лимфоциты периферической крови (ЛПК) первичных онкогинекологических больных на терминальной стадии прогрессии канцерогенеза (32 наблюдения). Выбор данной модели аргументирован более высокой чувствительностью этих клеток к воздействию мутагенных факторов, в том числе ионизирующих излучений, по сравнению с реакцией аналогичных клеток здоровых доноров [7]. В работе руководствовались положением Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2008), которая предусматривает информированное согласие доноров и больных на участие в исследовании.

Культуру ЛПК облучали в дозе 0,3 Гр на рентгеновской установке “РУМ-17” (сила тока составляла 10 мА, напряжение — 200 кВ, фильтр Cu (0,5 мм), мощность дозы — 0,89 Гр/мин). АК вводили в культуру ЛПК сразу после облучения в концентрациях 20,0 и 80,0 мкг/мл крови, что эквивалентно терапевтической концентрации и в 4 раза превышает ее соответственно. Культивирование ЛПК, приготовление препаратов хромосом и цитогенетический (метафазный) анализ проводили с использованием стандартного протокола [8]. В качестве показателя пролиферативной активности лимфоцитов использовали значение митотического индекса (МИ), для чего определяли количество клеток, находящихся на стадии митоза. Для сравнения и интерпретации полученных результатов одновременно выполнено контрольное исследование на культуре ЛПК здоровых доноров (42 наблюдения) при аналогичных условиях облучения и дополнительном воздействии АК.

Для определения нестабильности микросателлитной ДНК ЛПК онкологических больных использовали ISSR-ПЦР метод [9]. Тотальную ДНК выделяли из цельной гепаринизированной крови больных с использованием набора ДНК-сорб-В (“АмплиСенс”, Россия). Амплификацию с шестью праймерами к микросателлитным повторам, динуклеотидным ((GA)₉C; (AC)₈G; (AC)₈C; (AG)₈T; (AG)₈CT) и тетра-нуклеотидному ((GACA)₄), выполняли в соответствии с работой [9].

Статистический анализ результатов исследования проводили стандартными методами с использованием программы Excel [10]. Достоверность данных оценивали при пороговом уровне значимости $p < 0,05$.

Данный методический подход позволяет моделировать гипотетические ситуации в условиях комбинированного действия ионизирующей радиации (ИР) и препаратов с возможной комутагенной активностью на генетическом уровне ЛПК онкологических больных в сравнении с контрольной группой здоровых доноров.

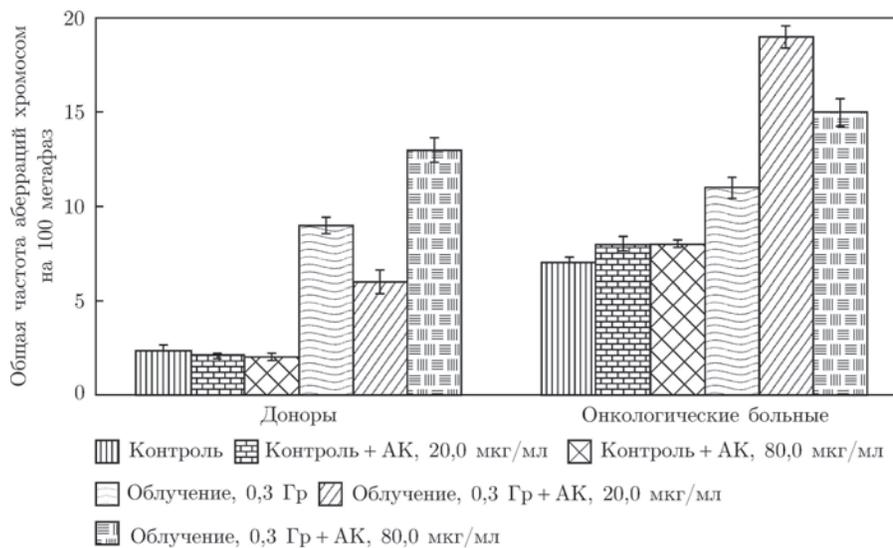


Рис. 1. Влияние комбинированного действия облучения (0,3 Гр) и АК (20,0 и 80,0 мкг/мл крови) на частоту индуцированных aberrаций хромосом в ЛПК доноров и онкологических больных

Результаты и обсуждение. Особенности формирования ХН в ЛПК онкологических больных в условиях комутагенной модификации лучевых эффектов. В начале исследований был изучен спонтанный уровень aberrаций хромосом в ЛПК онкологических больных, который позволил в дальнейшем оценить степень радиационно-индуцированной ХН. Цитогенетический анализ ЛПК больных до начала противоопухолевой терапии показал, что спонтанный уровень aberrаций хромосом превышал значения популяционного показателя и варьировал в интервале $5,0 \pm 0,7$ – $11,0 \pm 1,1$ aberrаций на 100 метафаз при среднем групповом значении $7,0 \pm 0,8$ на 100 метафаз (рис. 1). Наблюдаемое повышение частоты хромосомных изменений в ЛПК больных по сравнению с показателями контрольной группы может свидетельствовать о формировании ХН клеток вследствие процесса канцерогенеза, как источника окислительного стресса.

Установлено, что АК в исследованных концентрациях (20,0 и 80,0 мкг/мл) не влияет существенно на величину и спектр спонтанного уровня aberrаций хромосом в лимфоцитах крови как доноров, так и онкологических больных (см. рис. 1).

При рентгеновском облучении культуры ЛПК больных в малой дозе (0,3 Гр) и дополнительном воздействии АК в концентрациях 20,0 и 80,0 мкг/мл крови регистрируются комутагенные эффекты: повышение общей частоты aberrаций хромосом в 1,7–1,4 раза по сравнению с эффектом облучения в малой дозе (0,3 Гр) и в 2,7 и 2,1 раза соответственно по сравнению с интактным контролем (см. рис. 1). Наблюдаемый эффект АК формируется в основном за счет aberrаций хромосомного типа (дичетрических и кольцевых хромосом, парных фрагментов), т. е. радиационно-индуцированных перестроек хромосом.

Показано, что постлучевое воздействие АК в терапевтической концентрации оказывает радиозащитное действие на клетки доноров, уменьшая общую частоту радиационно-индуцированных aberrаций хромосом примерно в 1,5 раза по сравнению с эффектом облучения (см. рис. 1). Согласно данным работы, выполненной на растительных объектах, АК в диапазоне относительно невысоких концентраций проявляет радиопротекторные свойства путем утилизации свободных радикалов и повышения антиоксидантного статуса клеток [11]. При

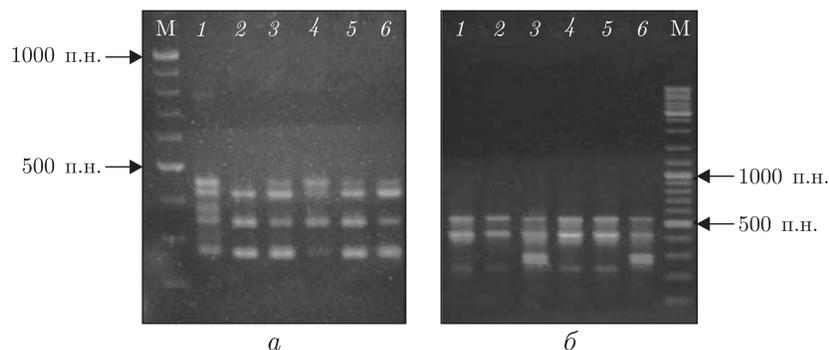


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером $(AG)_8T$ (а) и $(AG)_8CT$ (б). М — маркер молекулярной массы; 1 — контроль; 2 — образец крови при действии АК, 20,0 мкг/мл крови; 3 — образец крови при действии АК, 80,0 мкг/мл; 4 — образец крови при облучении в дозе 0,3 Гр; 5 — образец крови при сочетанном действии облучения и АК, 20,0 мкг/мл; 6 — образец крови при сочетанном действии облучения и АК, 80,0 мкг/мл

дальнейшем повышении концентрации препарата до 80,0 мкг/мл отмечается комутагенный эффект, а именно увеличение частоты aberrаций в ЛПК доноров по сравнению с эффектом облучения (0,3 Гр) примерно в 1,4 раза (см. рис. 1). Полученные данные позволяют заключить, что дополнительное воздействие АК на облученные *in vitro* клетки крови онкологических больных, независимо от ее концентрации и в отличие от результатов исследований на клетках доноров, вызывает только *комутагенные* эффекты.

Особенности формирования МН в ЛПК онкологических больных в условиях комутагенной модификации лучевых эффектов. Согласно современным представлениям, формирование МН отражает снижение эффективности функционирования системы репарации ДНК и свидетельствует о высокой вероятности возникновения трансформирующих мутаций по всему геному [12]. Доминирующим механизмом формирования МН является репликационное “проскальзывание” ошибок репарации, регистрация которых в двух и более локусах микросателлитов свидетельствует о “высокой частоте” МН [13].

В нашем исследовании четыре праймера $(GA)_9C$; $(AC)_8G$; $(AC)_8C$; $(GACA)_4$ оказались мономорфными, а два праймера, содержащих повтор $(AG)_8$, позволили выявить отличия между исследуемыми образцами крови. Размер продуктов амплификации варьировал от 200 до 700 п. н., а их количество составило от 3 до 7 ампликонов.

Результаты проведенного ПЦР-анализа с праймерами к микросателлитным повторам выявили, что исследуемые факторы ИР и АК оказывают поражающее воздействие на генетический материал клеток крови онкологических больных. При анализе спектров продуктов амплификации с праймером $(AG)_8T$ показано, что паттерны ампликонов образцов, подвергшихся действию радиационного (рентгеновские лучи) и химического (АК) факторов, отличаются от набора ПЦР-фрагментов в контрольных вариантах исследования (рис. 2, а). Кроме того, спектр ампликонов в образцах при действии АК в терапевтической концентрации отличался от остальных образцов (см. рис. 2, а). Выявленные отличия в спектре ампликонов контрольного и исследуемых образцов являются следствием изменения в участках повторяющейся ДНК, а именно МН, которая формируется в результате нарушений в системе репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair). Именно нестабильность динуклеотидных повторов связывают с подавлением активности этой системы репарации на этапе прогрессии злокачественных новообразований различных локализаций [14].

При использовании праймера (AG)₈CT отличия в спектре ПЦР-продуктов обнаружены в образцах крови при действии АК в высокой концентрации (80,0 мкг/мл крови), а также при ее комбинированном действии с ИР в дозе 0,3 Гр (см. рис. 2, б). Выявленные отличия в паттернах фрагментов амплификации с праймером (AG)₈CT свидетельствуют о реорганизации нуклеотидной последовательности при действии АК в высокой концентрации вследствие ошибки репарационных событий.

Показано, что при использовании праймера (AG)₈CT наиболее выраженная МН генома обнаруживается при воздействии АК в высокой концентрации (80,0 мкг/мл крови). Таким образом, МН обусловлена воздействием АК, которая в больших дозах может усиливать окислительный стресс, индуцированный ИР [15]. Обнаруженная нами МН генома возникла как следствие повреждающего действия АК на облученные в малой дозе клетки онкологических больных в результате нарушений системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов.

Митотическая активность ЛПК онкологических больных в условиях комутагенной модификации лучевых эффектов. Известно, что ЛПК человека осуществляют иммунный надзор за антигенным постоянством внутренней среды организма, а способность к бластотрансформации отражает их функциональную активность. Исходя из этого МИ лимфоцитов крови правомочно использовать в качестве дополнительного критерия экспресс-оценки их пролиферативного потенциала как при облучении, так и в условиях модификации лучевых эффектов.

Определение пролиферативного потенциала ЛПК первичных онкологических больных в зависимости от стадии прогрессии заболевания показало следующее. На II стадии заболевания МИ лимфоцитов больных подавляется на 35% по сравнению с показателями условно здоровых лиц (41,23 и 63,7‰ соответственно), на III стадии — более чем на 50% (26,92 и 63,7‰ соответственно), что может быть следствием иммунодепрессии, нарастающей с прогрессированием заболевания. С прогрессированием опухолевого роста МИ лимфоцитов крови больных III стадии подавляется на 35% по сравнению с показателями МИ больных II стадии.

Впервые установлено, что АК, независимо от ее концентрации (20,0 и 80,0 мкг/мл крови), оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность лимфоцитов онкологических больных, повышая МИ в 1,3 раза по сравнению с контролем. При сочетанном действии с облучением (0,3 Гр), независимо от концентрации, АК также стимулирует пролиферативный потенциал ЛПК больных, повышая при этом МИ клеток по сравнению с эффектом облучения примерно в 2 раза (рис. 3).

Ввиду высокой радиочувствительности клеток крови онкологических больных [7], не исключено, что стимулирующий эффект АК на митотическую активность лимфоцитов обусловлен “снятием” радиационно-индуцированной задержки митозов, что сокращает время, необходимое для репарации первичных повреждений. Повышение общей частоты aberrаций хромосом в аналогичных условиях эксперимента (см. рис. 1) может свидетельствовать в пользу такого предположения.

Таким образом, получены новые факты, отражающие качественные и количественные особенности формирования нестабильности генома в облученных клетках крови онкологических больных под воздействием комутагена АК, влияющего на систему репарации. Усложнение МН и ХН в соматических клетках больных под влиянием терапевтического облучения и дополнительного действия препарата с комутагенной активностью повышает вероятность развития вторичных опухолей.

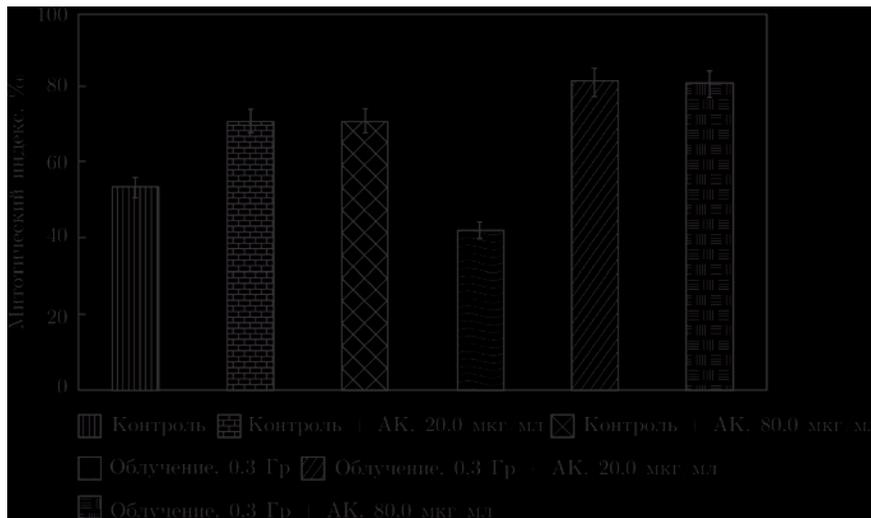


Рис. 3. Влияние комбинированного действия облучения (0,3 Гр) и АК (20,0 и 80,0 мкг/мл крови) на митотическую активность ЛПК онкологических больных

Полученные данные целесообразно учитывать в онкологической практике при назначении препаратов с комутагенными свойствами больным, которым показано терапевтическое облучение, для профилактики развития вторичных опухолей радиационного генеза.

Цитированная литература

1. *Losi L., Baisse B., Bouzourene H., Benhattar J.* Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression // *Cancerogenesis*. – 2005. – **26**, No 5. – P. 916–922.
2. *Карпеченко Н. Ю., Гасанова В. К., Попенко В. И., Якубовская М. Г.* Влияние СА-микросателлитов на гомологичную рекомбинацию // *Технологии живых систем*. – 2013. – № 9. – С. 33–39.
3. *Gorringe K. L., Chin S. F., Pharoah P., Staines J. M., Oliveira C., Edwards P. A., Caldas C.* Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer // *Cancerogenesis*. – 2005. – **26**, No 5. – P. 923–930.
4. *Дурнев А. Д., Серединин С. Б.* Комутагенез – новое направление исследований генотоксикологии // *Бюл. эсперим. биологии и медицины*. – 2003. – **135**, № 6. – С. 604–612.
5. *Дьоміна Е. А., Пилипчук О. П.* Радіаційно-індуковані аберації хромосом в лімфоцитах людини за дії комутагенів (дослідження *in vitro*) // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2013. – **11**, № 3. – С. 46–52.
6. *Свергун В. Т., Коваль А. Н.* Динамика изменения содержания аскорбиновой кислоты у крыс при внешнем облучении // *Материалы междунар. науч. конф., Гомель, 26–27 сентября 2013 г.* – Минск: Ин-т радиологии, 2013. – С. 143–144.
7. *Saxena A. K., Agarwal C. S., Kumar M., Srivastava A. K., Singh G.* Spontaneous unusual expression of frequency of chromosome aberrations and common fragile in human lymphocytes of colorectal cancer patients induced by Aphidicolin // *J. Exp. Ther. Oncol.* – 2007. – **6**, No 2. – P. 175–179.
8. *Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies.* – Vienna: IAEA, 2011. – 232 p.
9. *Kravets E. A., Zelena L. B., Zabara E. P., Blume Ya. B.* Adaptation strategy of barley plants to UV-B radiation // *Emir. J. Food Agric.* – 2012. – **24**, No 6. – P. 632–645.
10. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морион, 2001. – 408 с.
11. *Jagetia G. C.* Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2007. – **40**. – P. 74–81.

12. Животовский Л. А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Вестн. ВОГиС. – 2006. – **10**, № 1. – С. 74–96.
13. Елистратова Е. В., Лактионов П. П., Шелестюк П. И., Тузыкков С. А., Власов В. В., Рыкова Е. Ю. Иммунохимические и молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака желудка // Биомед. химия. – 2009. – **55**, № 1. – С. 15–31.
14. Shokal U., Sharma P. C. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers // Indian J. Med. Res. – 2012. – **135**, No 5. – P. 599–613.
15. Nikolić B., Stanojević J., Vuković-Gačić B., Simić D., Knežević-Vukčević J. K. Effects of Vitamin C on Oxidative DNA Damage and Mutagenesis // Food Technol. Biotechnol. – 2006. – **44**, No 4. – P. 449–456.

References

1. Losi L., Baisse B., Bouzourene H., Benhattar J. Carcinogenesis, 2005, **26**, No 5: 916–922.
2. Karpechenko N. Y., Hasanov V. K., Popenko V. I., Yakubovskaya M. G. Technologies of living systems, 2013, No 9: 33–39 (in Russian).
3. Goringe K. L., Chin S. F., Pharoah P., Staines J. M., Oliveira C., Edwards P. A., Caldas C. Carcinogenesis, 2005, **26**, No 5: 923–930.
4. Durnev A. D., Seredynyn S. B. Bull. Experim. Biology and Medicine, 2003, **135**, No 6: 604–612 (in Russian).
5. Domina E. A., Pylypchuk E. P. Bull. of Ukrainian Society of Geneticists and Selectionists, 2013, **11**, No 3: 46–52 (in Ukrainian).
6. Sverhun V. T., Koval A. N. Proc. of the Intern. Sci. Conf. Radiation, ecology and Technosphere. Minsk, 26–27 Sept., 2013: 143–144 (in Russian).
7. Saxena A. K., Agarwal C. S., Kumar M., Srivastava A. K., Singh G. J. Exp. Ther. Oncol., 2007, **6**, No 2: 175–179.
8. Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna: IAEA, 2011.
9. Kravets E. A., Zelena L. B., Zabara E. P., Blume Ya. B. Emir. J. Food Agricult., 2012, **24**, No 6: 632–645.
10. Lapach S. N., Chubenko A. V., Babich P. N. Statistical methods in researches for medicine and biology with the use of Excel, Kiev: Morion, 2001 (in Russian).
11. Jagetia G. C. J. Clin. Biochem. Nutr., 2007, **40**: 74–81.
12. Zhyvotovskyy L. A. Vestnik VOGiS, 2006, **10**, No 1: 74–96 (in Russian).
13. Elystratova E. V., Laktyonov P. P., Shelestiuk P. I., Tuzykov S. A., Vlasov Vol. V, Rukova E. Y. Biomed. Chemistry, 2009, **55**, No 1: 15–31 (in Russian).
14. Shokal U., Sharma P. C. Indian J. Med. Res., 2012, **135**, No 5: 599–613.
15. Nikolić B., Stanojević J., Vuković-Gačić B., Simić D., Knežević-Vukčević J. K. Food Technol. Biotechnol., 2006, **44**: 449–456.

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев
Национальный институт рака МЗ Украины, Киев
Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 24.12.2014

Е. А. Дьоміна, В. С. Іванкова, О. П. Пилипчук, Л. Б. Зелена

Формування хромосомної та мікросателітної нестабільності в клітинах крові онкологічних хворих при комбінованій дії *in vitro* іонізуючої радіації та комутагенів

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

Національний інститут раку МОЗ України, Київ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Вперше досліджено якісні та кількісні закономірності формування нестабільності геному в опромінених соматичних клітинах онкологічних хворих під впливом комутагена аскорбінової кислоти. Залежно від концентрації препарату комутагенні ефекти виявлялись у підвищенні частоти аберацій хромосом в 1,4–1,7 рази за рахунок зниження ефективності системи репарації пошкоджень. Одержані дані доцільно враховувати в радіаційній онкології для контролю призначення хворим препаратів з комутагенними властивостями з метою профілактики розвитку вторинних пухлин.

Ключові слова: опромінення, аскорбінова кислота, радіаційно-індуковані аберації хромосом, мікросателітна нестабільність, комутагенні ефекти, лімфоцити периферичної крові онкогінекологічних хворих.

E. A. Domina, V. S. Ivankova, O. P. Pylypchuk, L. B. Zelena

Formation of the chromosomal and microsatellite instabilities in blood cells of cancer patients under the combined exposure *in vitro* to ionizing radiation and co-mutagens

R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kiev

National Cancer Institute of the Ministry of Health of Ukraine, Kiev

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

This work presents the first studies of the quantitative and qualitative patterns of genome instability formation in irradiated somatic cells of cancer patients under the influence of a co-mutagen ascorbic acid. Depending on the drug concentration, the co-mutagenic effects were revealed as an increased frequency of chromosomal aberrations by 1.4–1.7 times due to the repair system repression. The obtained results should be taken into account in the radiation oncology for the control over co-mutagenic drug prescriptions to the patient to prevent the development of secondary tumors.

Keywords: irradiation, ascorbic acid, radiation-induced chromosomal aberrations, microsatellite instability, co-mutagenic effects, peripheral blood lymphocytes of cancer patients.