

О. П. Пилипчук, Е. А. Дьоміна

Закономірності формування комутагенезу в опроміненних соматичних клітинах людини

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Вперше досліджено закономірності формування комутагенних ефектів в опроміненних клітинах (Т-лімфоцитах) здорових осіб під впливом верапамілу та аскорбінової кислоти. Визначено, що додаткова дія досліджених препаратів у концентраціях, що перевищують значення терапевтичної, потенціюють ефекти малих доз іонізуючої радіації (0,3 Гр) в 1,5 раза. При опроміненні у високих дозах (2,0 Гр) аскорбінова кислота та верапаміл виявляють комутагенні ефекти, підвищуючи рівень аберацій хромосом в 1,4 раза, незалежно від концентрації препаратів.

Ключові слова: комутагени, лімфоцити периферичної крові, аберації хромосом, верапаміл, аскорбінова кислота, іонізуюча радіація.

Малодослідженою проблемою радіобіології є формування явища комутагенезу в опроміненних клітинах людини, що може призводити до ускладнення (посилення) нестабільності геному. Інформація стосовно комутагенезу має фрагментарний та суперечливий характер, до цього часу не вирішене питання щодо участі системи репарації та інших механізмів у формуванні комутагенних ефектів. Оскільки комутагени самостійно не здатні викликати локальні зміни генетичного матеріалу, то вони не виявляються при генотоксичному скринінгу, а їх неконтрольована наявність може підсилювати індукований мутагенез [1]. Беручи до уваги нечисленні дані літератури з цього питання, підвищений інтерес дослідників мають викликати можливі комутагенні ефекти деяких медичних препаратів, наприклад блокаторів кальцієвих каналів — верапамілу (В) [1, 2] та антиоксиданту — аскорбінової кислоти (АК), яка визнана „сигнальною молекулою, що виявляє специфічну активність у клітинах” [3]. Є дані, що показують можливість прояву комутагенних властивостей В, АК за умов комбінованої дії з агентами хімічної природи [4, 5], однак на сьогодні відсутні дослідження, які передбачали б вивчення впливу комутагенів на формування радіогенних ефектів у клітинах людини, насамперед радіочутливих. Тому метою дослідження було визначення закономірностей формування радіаційно-індукованих хромосомних перебудов в імунокомпетентних клітинах (Т-лімфоцитах) людини за умов додаткової дії потенційних комутагенів — препаратів медичного призначення (дослідження *in vitro*).

Матеріали і методи. Цитогенетичні дослідження виконано з використанням тест-системи лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб, які дали інформовану згоду на участь у дослідженнях. У роботі керувались положенням Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2008 р.), а також загальними етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.). Культивування ЛПК здійснювали за модифікованим методом [6] з використанням мітогену фітогемаглютеніну (ФГА) протягом 52 год. Алгоритм проведення досліджень проілюстровано на рис. 1.

Зразки крові умовно здорових осіб опромінювали на рентгенівській установці “РУМ-17” в G₀- та G₂-періодах клітинного циклу (на 0 та 46 год інкубації клітин відповідно) за таких

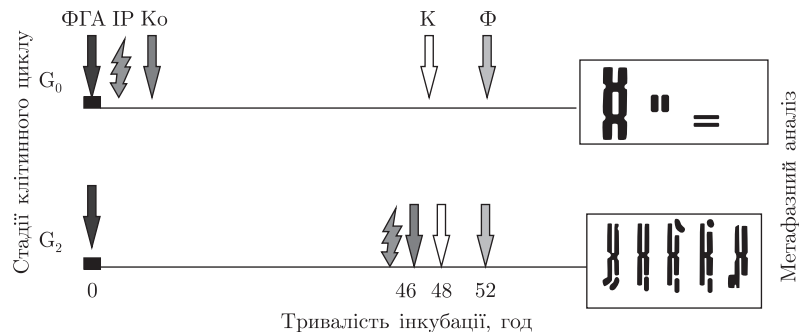


Рис. 1. Алгоритм дослідження впливу комутагенів на радіочутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові донорів. ФГА — фітогемаглютинін, ІР — іонізуюча радіація, Ко — комутаген, К — колцемід, Ф — фіксація культури клітин

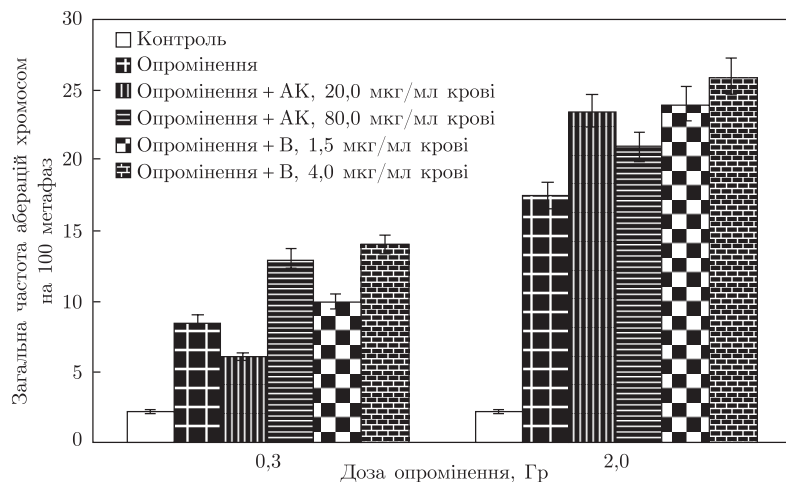


Рис. 2. Загальна частота аберацій хромосом у культурі ЛПК донорів при опроміненні в G_0 -періоді клітинного циклу за умов комбінованої дії ІР (0,3 та 2,0 Гр) і комутагенів В (1,5 та 4,0 мкг/мл), АК (20,0 та 80,0 мкг/мл)

умов: потужність дози 89 сГр/хв, сила струму 10 мА, напруга 180 кВ, фільтр 0,5 Сu; діапазон досліджуваних доз 0,3–2,0 Гр. Як комутагени нами було використано два медичних препарати — В та АК, які вводили в культуру ЛПК одразу після опромінення в концентраціях: В 1,5 та 4,0 мкг/мл крові (максимальній терапевтичній концентрації та в 4 рази вищій за неї), АК — 20,0 та 80,0 мкг/мл (терапевтичній концентрації та в 4 рази вищій за неї). Метафазний аналіз хромосом у Т-лімфоцитах виконували за загальноприйнятими критеріями відповідно до стандартного протоколу [6]. Математичну обробку одержаних експериментальних даних проводили стандартними методами з використанням програми Excel [7].

Результати і обговорення. У роботі досліджено вплив комутагенів В і АК на формування радіаційно-індукованих хромосомних перебудов у соматичних немалігнізованих клітинах людини, залежність явища комутагенезу від концентрації комутагенів при дії ІР у широкому діапазоні доз. На цитогенетичному рівні соматичних клітин людини встановлено, що досліджувані препарати незалежно від концентрації не впливають на спонтанний рівень аберацій хромосом ЛПК, тобто не мають власної мутагенної активності. Формування комутагенних ефектів В і АК в залежності від дози опромінення проілюстровано на рис. 2.

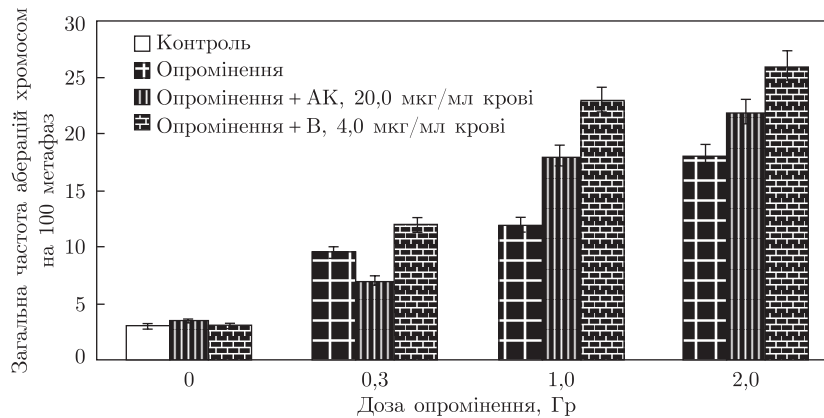


Рис. 3. Загальна частота аберацій хромосом у культурі ЛПК донорів при опроміненні в G_2 -періоді клітинного циклу за умов комбінованої дії ІР (0,3–2,0 Гр) і комутагенів В (4,0 мкг/мл) та АК (20,0 мкг/мл)

Аналізуючи результати дослідження при комбінованій дії малих доз опромінення та комутагенів, можна стверджувати, що комутагенні ефекти даних препаратів залежать від концентрації. Так, В у концентрації 1,5 мкг/мл крові істотно не впливає на рівень радіаційно-індукованих пошкоджень хромосом. Однак використання комутагена в концентрації 4,0 мкг/мл потенціє пошкоджуючу дію ІР, підвищуючи загальну частоту аберацій хромосом приблизно в 1,5 раза. При комбінованій дії ІР (0,3 Гр) та АК у терапевтичній концентрації (20,0 мкг/мл крові) останній фактор виявляє радіозахисний ефект, який виражається в зменшенні загальної частоти аберацій хромосом порівняно з ефектом тільки опромінення приблизно в 1,5 раза (див. рис. 2). З підвищенням концентрації АК (80,0 мкг/мл крові) загальна частота радіаційно-індукованих аберацій хромосом зростає приблизно в 1,4 раза порівняно з ефектом опромінення. Вчені вважають, що при певних експериментальних умовах АК здатна виявляти прооксидантну активність, що призводить до оксидативного пошкодження клітин [8]. Таким чином, АК здатна виявляти як радіозахисні, так і комутагенні ефекти залежно від концентрації препарату.

При опроміненні культури у відносно високих дозах (2,0 Гр) комутагенні ефекти АК і В зберігаються незалежно від значень концентрації і виявляються у підвищенні загальної частоти аберацій хромосом в 1,4 раза за рахунок аберацій хромосомного типу (див. рис. 2). Оскільки опромінення поряд з розривами хромосом може індукувати передмутаційні потенційні зміни в них, то додаткова дія комутагенів у високій концентрації може сприяти їх реалізації в структурні перебудови хромосом, у тому числі за рахунок пригнічення ферментів репарації [9]. Таким чином, можна стверджувати, що комутагени підвищують рівень хромосомних перебудов в опромінених клітинах людини за рахунок пригнічення процесів репарації.

Враховуючи отримані дані щодо неоднозначного характеру дії АК у терапевтичній концентрації та В у відносно високих концентраціях, ми провели дослідження комутагенних ефектів цих препаратів у найбільш радіочутливому G_2 -періоді клітинного циклу (рис. 3), що, в свою чергу, дасть можливість деталізувати явище комутагенезу. Аналіз зареєстрованих радіаційно-індукованих хромосомних змін в ЛПК у G_2 -періоді показав, що в спектрі пошкоджень переважають аберації хроматидного типу.

Показано, що комутагенні ефекти В (4,0 мкг/мл крові) реєструються у всіх експериментальних точках дослідження, так само як за умов опромінення в G_0 -періоді клітинного

циклу. Найбільший ефект спостерігався при опроміненні в дозі 1,0 Гр — за умов комутагенної модифікації число аберацій хромосом збільшилося приблизно вдвічі. На відміну від В, АК виявляє комутагенні ефекти починаючи з дози 1,0 Гр. При опроміненні в дозі 0,3 Гр даний препарат виявляє лише радіозахисні властивості, що, в свою чергу, свідчить про те, що явище комутагенезу на хромосомному рівні клітин залежить від величини поглиненої дози ІР. За умов комбінованої дії відносно високих доз опромінення (2,0 Гр) та АК і В рівень радіаційно-індукованих аберацій хромосом підвищується приблизно в 1,4 раза порівняно з ефектом лише опромінення. Характер мутаційних змін в ЛПК донорів значною мірою залежить від умов, в яких відбуваються процеси мутагенезу. Інколи потенційні зміни, що виникли при дії мутагенів, у тому числі ІР в молекулах ДНК, можуть не виявлятися як мутації, у зв'язку з чим спостерігається відновлення початкових структур за допомогою роботи систем репарації. Однак додаткова дія комутагенів, які здатні посилювати пошкоджуючу дію мутагенів, може стимулювати подальшу реалізацію передмутаційних змін у хромосомні перебудови за рахунок пригнічення роботи ферментів репарації [9].

На підставі результатів виконаних цитогенетичних досліджень встановлено такі особливості впливу комутагенів на реалізацію радіаційно-індукованих пошкоджень хромосомного апарату ЛПК:

препарати різного медичного призначення (В — кардіологічний, АК — антиоксидант) за певних умов виявляють схожі комутагенні ефекти в опроміненіх імункомпетентних клітинах (Т-лімфоцитах) здорових осіб;

за умов дії малих доз радіації (0,3 Гр) комутагенні ефекти *залежать* від концентрації препаратів;

у разі дії відносно високих доз опромінення (2,0 Гр) комутагенні ефекти *не залежать* від концентрації препаратів;

комутагени підвищують рівень хромосомних перебудов в опроміненіх клітинах за рахунок пригнічення процесів репарації.

Таким чином, вперше на основі цитогенетичних досліджень встановлено комутагенний вплив препаратів В і АК на опромінений геном людини. Формування комутагенних ефектів В і АК у радіочутливих клітинах людини залежить як від концентрації препаратів, так і дози опромінення.

Отримані результати доцільно враховувати з метою корекції медичних показань для індивідуального призначення препаратів з комутагенними властивостями особам, які працюють у сфері дії іонізуючих випромінювань.

Цитована література

1. Дурнев А. Д., Серединин С. Б. Комутагенез – новое направление исследований генотоксикологии // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2003. – **135**, № 6. – С. 604–612.
2. Пішак В. П., Бажора Ю. І. Медична біологія. – Вінниця: Нова Книга, 2004. – 656 с.
3. Свєргун В. Т., Коваль А. Н. Динамика изменения содержания аскорбиновой кислоты у крыс при внешнем облучении // Материалы междунар. науч. конф., 26–27 сент. 2013 г. – Минск: Ин-т радиологии, 2013. – С. 143–144.
4. Дьоміна Е. А., Михайленко В. М., Пилипчук О. П. Вплив оксиду азоту на формування хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові людини в умовах ко-мутагенної модифікації // ScienceRise. – 2015. – **2**, № 1(7). – С. 7–10.
5. Milosević-Djordjević O., Grujić D., Joksić G., Marinković D. *In vitro* evaluation of the genotoxicity of ritodrine and verapamil in human lymphocytes // Hum. Exp. Toxicol. – 2011. – **30**, No 5. – P. 398–405.
6. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies.* – Vienna: IAEA, 2011. – 232 p.

7. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морион, 2001. – 408 с.
8. *Рябченко Н. И., Рябченко В. И., Иванник Б. П., Дзиковская Л. А., Синькова Р. В., Грошева И. П., Дегтярева Е. С., Иванова Т. И.* Антиоксидантные и прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты, дигидрокверцетина и мексидола в радикальных реакциях, индуцированных ионизирующим излучением и химическими реагентами // Радиационная биология. Радиэкология. – 2010. – **50**, № 2. – С. 186–194.
9. *McNeill D. R., Wong H. K., Narayana A., Wilson D. M.* Lead promotes abasic site accumulation and comutagenesis in mammalian cells by inhibiting the major abasic endonuclease Ape1 // Mol. Carcinog. – 2007. – **46**, No 2. – P. 91–99.

References

1. *Durnev A. D., Seredynyn S. B.* Bull. Experim. Biology and Medicine, 2003, **135**, No 6: 604–612 (in Russian).
2. *Pishak V. P., Bazhora Y. I.* Medical Biology, Vinnitsa: Nova Knyga, 2004 (in Ukrainian).
3. *Svergun V. T., Koval A. N.* Dynamics of changes in the content of ascorbic acid in rats with external irradiation, Proc. of the Intern. sci. conf., Minsk: Institute of Radiology, 2013: 143–144 (in Russian).
4. *Domina E. A., Mikhailenko V. M., Pylypchuk E. P.* ScienceRise, 2015, **2**, No 1(7): 7–10 (in Ukrainian).
5. *Milosević-Djordjević O., Grujićić D., Joksić G., Marinković D.* Hum. Exp. Toxicol., 2011, **30**, No 5: 398–405.
6. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*, Vienna: IAEA, 2011.
7. *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).
8. *Riabchenko N. I., Riabchenko V. I., Ivannik B. P., Dzikovskaia L. A., Sin'kova R. V., Grosheva I. P., Degtiareva E. S., Ivanova T. I.* Radiation Biology. Radioecology, 2010, **50**, No 2: 186–194 (in Russian).
9. *McNeill D. R., Wong H. K., Narayana A., Wilson D. M.* Mol. Carcinog., 2007, **46**, No 2: 91–99.

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

Надійшло до редакції 05.03.2015

Е. П. Пилипчук, Э. А. Демина

Закономерности формирования комутагенеза в облученных соматических клетках человека

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

Впервые исследованы закономерности формирования комутагенных эффектов в облученных клетках (Т-лимфоцитах) здоровых лиц под влиянием верапамила и аскорбиновой кислоты. Определено, что дополнительное действие исследованных препаратов в концентрациях, превышающих значение терапевтической, потенцируют эффекты малых доз ионизирующей радиации (0,3 Гр) в 1,5 раза. При облучении в высоких дозах (2,0 Гр) аскорбиновая кислота и верапамил проявляют комутагенные эффекты, повышая уровень аберраций хромосом в 1,4 раза, независимо от концентрации препаратов.

Ключевые слова: комутагены, лимфоциты периферической крови, аберрации хромосом, верапамил, аскорбиновая кислота, ионизирующая радиация.

O. P. Pylypchuk, E. A. Domina

Regularities of the formation of comutagenesis in irradiated human somatic cells

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

The pattern (regularity) of co-mutagenic effects formation in healthy individuals' irradiated cells (T-lymphocytes) under verapamil and ascorbic acid treatment is studied. It is determined that the additional action of the investigated drugs in concentrations greater than the therapeutic one potentiate the effects of low doses of ionizing radiation by 1.5 times. Ascorbic acid and verapamil show co-mutagenic effects under high-dose irradiation (2.0 Gy), increasing the chromosomal aberration level by 1.4 times, regardless of the concentration of drugs.

Keywords: comutagen, peripheral blood lymphocytes, chromosomal aberrations, verapamil, ascorbic acid, ionizing radiation.