

УДК 612.014.482:575.224.23

## **РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНІ АБЕРАЦІЇ ХРОМОСОМ У ЛІМФОЦИТАХ ЛЮДИНИ ЗА ДІЇ КО-МУТАГЕНІВ (ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*)**

Е.А. ДЬОМІНА, О.П. ПИЛИПЧУК

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Е. Кавецького НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45

e-mail: lena.pylypchuk@ukr.net

**Мета.** Визначення особливостей утворення аберацій хромосом в опроміненіх соматичних клітинах людини залежно від дози іонізуючої радіації та концентрації ко-мутагену.

**Методи.** Використано тест-систему культури лімфоцитів периферичної крові людини з метафазним аналізом аберацій хромосом. **Результати.** У роботі встановлено явище ко-мутагенезу на хромосомному рівні за умов комбінованої дії опромінення (0,3–2,0 Гр) та верапамілу (1,5–4,0 мкг/мл) у лімфоцитах периферичної крові людини (*in vitro*). Верапаміл у концентрації 4,0 мкг/мл потенціює пошкоджуючу дію малих доз радіації ~ в 1,5 разу. У спектрі індукованих пошкоджень переважають аберації хромосомного типу, частота яких зростає з підвищенням концентрації ко-мутагену (1,5–4,0 мкг/мл). **Висновок.** У рамках виконаних модельних експериментів встановлено, що пригнічення системи репарації під впливом ко-мутагену є домінуючим механізмом у підвищенні частоти прояву променевих цитогенетичних маркерів – аберацій хромосомного типу.

**Ключові слова:** ко-мутагенез, іонізуюче випромінювання, верапаміл, радіаційно-індуковані аберації хромосом, соматичні клітини людини.

**Вступ.** У наш час мало уваги приділяється дослідженням ко-мутагенезу – посиленню пошкоджуючої дії мутагенів, у т.ч. іонізуючої радіації (ІР), під впливом немутагенних сполук. Небезпека ко-мутагенів полягає в тому, що вони не мають власної мутагенної активності і тому не виявляються при генотоксичному скринінгу. При цьому неконтрольована присутність їх у середовищі може підвищувати негативні ефекти мутагенів, у тому числі деяких медичних препаратів [1, 2].

Дослідження явища ко-мутагенезу мають фрагментарний та суперечливий характер, вони не завжди враховують множинність механізмів реалізації ко-мутагенної дії різних сполук при інтерпретації даних, зокрема участі репараційних процесів у формуванні ко-мутагенних ефектів, характеру дозових та часових залежностей [1, 3–5]. У зв'язку з неухильним збільшенням віддалених негативних медико-біологічних наслідків Чорнобильської катастрофи дослідницький інтерес закордонних та вітчизняних фахівців у галузі фундаментальної та клінічної радіобіології зосередився на поглибленому вивченні мутагенних і канцерогенних ефектів ІР. Досі не з'ясовано, як впливають ко-мутагени на закономірності утворення генетичних пошкоджень в опроміненіх клітинах людини. Враховуючи онкогенну небезпеку підвищеного рівня хромосомних змін у

клітинній популяції [6], актуальним є дослідження явища ко-мутагенезу на хромосомному рівні в імуннокомпетентних клітинах людини, а саме — характер залежності комбінованого ефекту від дози опромінення та концентрації ко-мутагенів.

Мета роботи – визначити закономірності утворення аберацій хромосом в опроміненіх соматичних клітинах людини залежно від дози ІР та концентрації ко-мутагену (дослідження *in vitro*).

Як ко-мутаген використано медичний препарат верапаміл (В), який є антагоністом кальцію [7, 8]. Встановлено, що довготривала терапія антагоністами кальцію не спричиняє збільшення частоти хромосомних пошкоджень у клітинах людини [9], що, в свою чергу, свідчить про те, що обраний нами медичний препарат В не виявляє власної мутагенної активності. Але при цьому показано, що антагоністи кальцію суттєво підсилюють мутагенні ефекти протипухлинних препаратів [10].

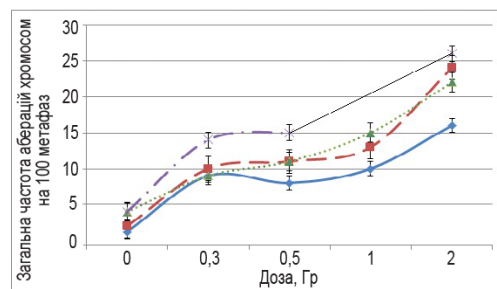
### Матеріали і методи

У роботі використано тест-систему культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб із подальшим метафазним аналізом аберацій хромосом. ЛПК людини належать до класу вегетативних інтермітотичних клітин, тобто до найчутливіших до дії мутагенів, у тому числі ІР [11], що дозволяє моделювати явище ко-мутагенезу за різних експериментальних умов (20 спостережень). У роботі керувалися положенням Гельсинської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 р.), яка передбачає інформовану згоду донорів на добровільну участь у дослідженні. Культивування ЛПК здійснювали за модифікованим методом [12] з використанням мітогену фітогемаглютеніну (ФГА) протягом 52 год. Метафазний аналіз хромосом виконували за загальноприйнятими критеріями та з елементами часткового каріотипування [13]. На кожне спостереження

аналізували в середньому по 200–300 метафаз, всього проаналізовано більше 4000 метафаз. Опромінення зразків крові (лімфоцитів в  $G_0$  – періоді клітинного циклу) здійснювали на терапевтичній установці «Рокус» з джерелом  $\gamma$ -променів  $^{60}\text{Co}$  (потужність дози 0,89 Гр/хв, сила струму 10 мА, напруга 180 кВ, фільтр 0,5 Сu) в діапазоні доз 0,3–2,0 Гр. Ко-мутаген В вводили в культуру ЛПК одразу після опромінення в діапазоні концентрацій 1,5–4,0 мкг/мл крові, що перевищувало терапевтичну дозу в 1,5–4,0 рази, відповідно. Статистичну обробку проводили згідно з загальноприйнятими рекомендаціями [14].

### Результати та обговорення

При аналізі частоти та спектра індукованих пошкоджень хромосом при опроміненні ЛПК в  $G_0$  фазі клітинного циклу в діапазоні доз 0,3–2,0 Гр та дії ко-мутагену В у діапазоні концентрацій 1,5–4,0 мкг/мл крові у всіх випадках на дозовій кривій відзначали підвищення загальної частоти аберацій хромосом у порівнянні з опроміненням (рис. 1). Найбільший ко-мутагенний ефект В спостерігали при використанні препарату в концентрації 4,0 мкг/мл та опроміненні в дозі 2,0 Гр (підвищення загальної частоти пошкоджень хромосом  $\sim 1,6$  разу). В доступній нам літе-



**Рис. 1.** Загальна частота аберацій хромосом у культурі ЛПК при комбінованій дії ІР та ко-мутагену В в інтервалі концентрацій 1,5–4,0 мкг/мл; —●— ІР; —■— ІР+В (1,5 мкг/мл); —▲— ІР+В (2,0 мкг/мл); —×— ІР+В (4,0 мкг/мл)

ратурі відсутні роботи, які стосуються генетичних ефектів за умов комбінованої дії ко-мутагену В і ІР. Тому ми маємо можливість порівняти одержані результати тільки з даними робіт, в яких на цитогенетичному рівні соматичних клітин експериментальних тварин встановлено, що даний препарат, виступаючи в ролі ко-мутагену, підсилює дію деяких хімічних сполук, у тому числі антибіотиків [15, 16].

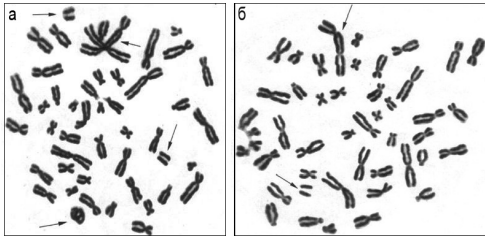


Рис. 2. Аберації хромосомного типу: а, б – обміни та фрагменти

У спектрі індукованих пошкоджень переважали аберації хромосомного типу, що визнані цитогенетичними променевими маркерами [17], частота яких зростала з підвищенням концентрації ко-мутагену (рис. 2). На дозовій кривій у діапазоні малих доз для частоти аберацій хромосомного типу реєструється плато (дозонезалежна ділянка), яке зберігається за умов додаткового впливу ко-мутагену В (рис.3). Обговоримо цей експериментальний факт більш детально. Як відомо, процеси репа-

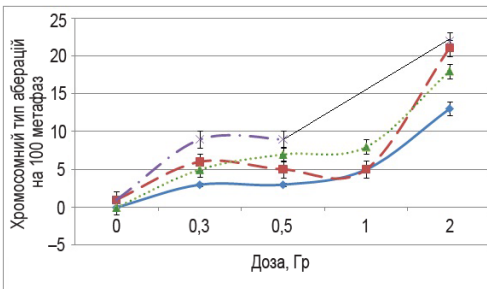


Рис. 3. Частота аберацій хромосомного типу в ЛПК за умов комбінованої дії ІР та ко-мутагену В в інтервалі концентрацій 1,5–4,0 мкг/мл. (Позначення див. на рис. 1.)

рації забезпечують відновлення інформаційної цілісності геному. Недостатність або помилковість цієї системи зумовлює злоякісне переродження клітин. Сьогодні відомо більше 150 генів (і відповідно – білків) людини, що беруть участь у репарації пошкоджень ДНК, у тому числі радіаційно-індукованих [18]. ІР спричиняє найрізноманітніші за своїм спектром пошкодження ДНК, що включають перетворення азотистих основ та вуглеводного залишку, окисне пошкодження основ, міжниткові та міжланцюгові зшивки, зшивки ДНК-білок, однониткові та двониткові розриви (ДР) ДНК. Саме ДР ДНК вважаються найнебезпечнішими пошкодженнями за своїми наслідками для клітини, оскільки зумовлюють нестабільність геному (підвищений рівень мутацій, хромосомних аберацій) [19].

Численні дискусії продовжують розгортатися навколо дії малих доз ІР на організм людини, що пов'язано зі складною нелінійною залежністю генетичних ефектів, а також підвищенням канцерогенного ризику в цьому діапазоні доз. Зауважимо, що результати цитогенетичних та радіаційно-епідеміологічних досліджень у групі учасників планових робіт з ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (більше 17 000 осіб) свідчать про те, що малі дози поглиненої ІР являють собою статистично значущі фактори підвищеного ризику виникнення злоякісних новоутворень [20]. Це може бути пов'язано з недостатньою інтенсивністю процесів елімінації аберантно змінених клітин системою імунного нагляду за антигенною сталістю внутрішнього середовища організму і процесів репарації. Виходячи з вищевикладеного важливим є з'ясування механізмів утворення дозонезалежної ділянки в лівій частині дозових кривих (рис. 3), а також можливого дозонезалежного прояву ко-мутагенних ефектів у клітинах людини за дії ІР у широкому діапазоні доз. При інтерпретації одержаних даних ми дотримуємося концепції видатного

радіобіолога М.В. Лучника, відповідно до якої в клітині існує два механізми репарації: «регулярна», яка забезпечує репарацію спонтанних генетичних пошкоджень, та «аварійна», що «вмикається» при відносно високих рівнях радіаційно-індукованих пошкоджень [21]. Керуючись положеннями цієї концепції, ми припускаємо, що реєстроване нами плато в лівій частині дозових кривих (рис. 3) можна пояснити тим, що за дії малих доз ІР «регулярна» репарація вже «не справляється» з індукованими генетичними пошкодженнями, але їхній рівень ще недостатньо високий, щоб включився механізм «аварійної» репарації [22].

Окремий інтерес викликає прояв ко-мутагенних ефектів у клітинах людини за дії малих доз ІР. У нашому дослідженні при опроміненні клітин у дозі 0,3 Гр загальна частота радіаційно-індукованих аберацій становить  $(9,0 \pm 0,86)$ . Показано, що В у діапазоні концентрацій 1,5–2,0 мкг/мл суттєво не впливає на рівень радіаційно-індукованих пошкоджень хромосом  $(10,0 \pm 1,1; 9,0 \pm 0,89)$ . Однак використання ко-мутагену в концентрації 4,0 мкг/мл потенціє пошкоджуючу дію ІР, підвищуючи загальну частоту аберацій хромосом  $\sim$  в 1,5 разу  $(14,0 \pm 1,12)$  (рис. 4). Формування ко-мутагенного ефекту В відбувалося за раху-

нок аберацій хромосомного типу, тобто променевих маркерів (рис. 5). З'ясування механізму «збереження» дозозалежної ділянки в лівій частині дозових кривих для різних цитогенетичних показників навіть за дії відносно високої концентрації В (4,0 мкг/мл) потребує подальших досліджень.

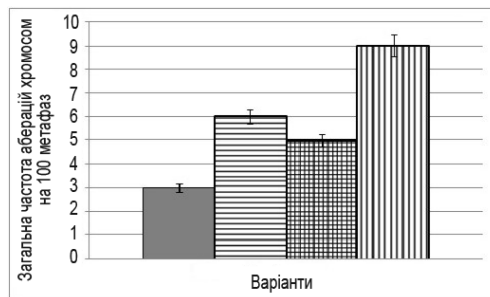


Рис. 5. Частота аберацій хромосомного типу в ЛПК при комбінованій дії малих доз ІР (0,3 Гр) та В в інтервалі концентрацій (1,5–4,0 мкг/мл). (Позначення див. на рис. 4.)

Наше ставлення до одержаних результатів таке. Існує кілька поглядів на механізми, що задіяні при дії хімічних агентів після опромінення клітин [23]. По-перше, хімічний агент блокує/пригнічує репаративні процеси, що пов'язані з пошкодженням молекул ДНК. По-друге, опромінення підвищує імовірність проникнення хімічного агента в клітини. По-третє, хімічний агент може перетворювати сублетальні радіаційно-індуковані пошкодження в потенційно летальні. І, нарешті, хімічні агенти можуть також перетворювати потенційно летальні пошкодження, що сформовані внаслідок дії ІР, у незворотні летальні пошкодження. Це свідчить, що досі відсутня універсальна точка зору на механізми прояву синергізму в індукції генетичного ефекту в клітинах людини за умов комбінованої дії ІР та хімічних агентів.

Ми дотримуємося першої точки зору: хімічний агент (у нашому дослідженні В) може істотно пригнічувати процеси репарації радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК, що сприяє більш інтенсивному фор-

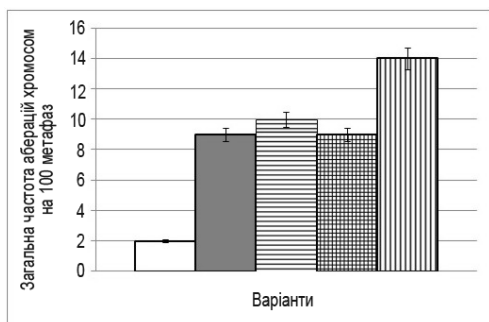


Рис. 4. Загальна частота аберацій хромосом у культурі ЛПК при комбінованій дії малих доз ІР (0,3 Гр) та В за різних концентрацій (1,5–2,0–4,0 мкг/мл): □ – контроль; ■ – опромінення (0,3 Гр); ▨ – В (1,5 мкг/мл); ▩ – В (2,0 мкг/мл); ▪ – В (4,0 мкг/мл)

муванню як загальної частоти хромосомних пошкоджень, так і променевих маркерів — аберацій хромосомного типу. У нашому дослідженні за умов додаткової дії В залежно від його концентрації та дози опромінення частота аберацій хромосомного типу підвищувалася (1,1–1,6 разу). Зауважимо, що таке припущення, поперше, не спростовує «теорію накопичення», відповідно до якої антагоністи кальцію (в тому числі В) затримують виведення з клітин цитотоксичних агентів, підвищуючи їхню мутагенну активність [5, 24], по-друге, не виключає того, що «ко-мутагени способны реализовывать свой негативный потенциал поливариантно» [1].

Усе це свідчить про перспективність продовження таких досліджень з використанням терапевтичних та субтерапевтичних доз В, а також за умов комбінованої дії опромінення та ко-мутагенів (В, кофеїн) у найбільш радіочутливій стадії життєвого циклу ЛПК – в кінці G<sub>2</sub>-періоду. Такий методичний підхід дозволить деталізувати явище ко-мутагенезу за дії малих доз опромінення та низьких концентрацій ко-мутагенів.

### Висновки

Вперше встановлено закономірності утворення радіаційно-індукованих аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини за умов модифікуючої дії ко-мутагену верапамілу. Ко-мутагенний ефект верапамілу проявляється за рахунок підвищення загальної частоти аберацій хромосом, у тому числі променевих маркерів – аберацій хромосомного типу, та залежить від його концентрації і дози опромінення. Верапаміл у концентрації 4,0 мкг/мл збільшує пошкоджуючу дію малих доз радіації ~ в 1,5 разу.

### Практичне значення

Одержані в роботі результати доцільно враховувати з метою розробки показань

для призначення медичних препаратів з комутагенним ефектом особам, що працюють у сфері дії іонізуючих випромінювань.

### Перелік літератури

1. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. – М.: Медицина, 1998. – 328с.
2. Molento M., Lifschitz A., Sallovitz J. et al. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxedectin in sheep // Parasitol. Res. – 2004. – Vol. 92. – P. 121–127.
3. Болтина И.В. Влияние *in vitro* верапамила и кетаминна на цитогенетические показатели у больных с опухолями головного мозга // Актуальні проблеми акушерства та гінекології, клінічної імунології та медичної генетики: зб. наук. пр. – К. – Луганськ, 2011. – Вип. 22. – С. 257–266.
4. Grujic D., Milosevic-Djordjevic O., Arsenijevic S. et al. Treatment of pregnant women with a beta mimetic and verapamil increases the micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. // Tohoku J. Exp. Med. – 2008. – Vol. 215. – P. 363–371.
5. Molento M., Lifschitz A., Sallovitz J. et al. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxedectin in sheep // Parasitol. Res. – 2004. – Vol. 92. – P. 121–127.
6. Sanberg A.A. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia // Mutat. Res. – 1991. – Vol. 247, № 2. – P. 231–240.
7. Пішак В.П., Бажора Ю.І. Медична біологія. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 656 с.
8. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Комутагенез – новое направление исследований генотоксикологии // Бюлл. эспер. биол. мед. – 2003. – Т. 135. – С. 604–612.
9. Andreassi M.G., Picano E., Del Ry S. et al. Effects of chronic long-term therapy with calcium antagonists on cytogenetic damage in humans // J. Hypertens. – 1999. – Vol. 17, № 6. – P. 843–846.
10. Scheid W., Weber J., Rottgers U. et al. Enhancement of the mutagenicity of anticancer drugs by the calcium antagonists verapamil and fendiline // Arzneimittelforschung. – 1991. – Vol. 41. – P. 901–914.
11. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. – М.: Медицина, 1991. – 494 с.
12. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: A manual. – Vienna: IAEA, 2001. – Technical Reports series № 405. – 126 p.



13. *International System of Cytogenetic Nomenclature for acquired chromosome aberrations / Mitelman F. et al.* – Basel: S. Karger, 1995. – 114 p.
14. *Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [2-е изд., перераб. и доп.] – К.: Морион, 2000. – 408 с.
15. *Nesterova E.V., Durnev A.D., Seredenin S.B.* Verapamil contributes to the clastogenic effects of acrylamide, cyclophosphamide, and dioxidine of somatic cells of BALB/C E.P.A., and C57BL mice // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 440. – P. 171–179.
16. *Gruber A.* Effect of verapamil on daunorubicin accumulation in human leukemic cells with different levels of MDR1 gene expression // *Leuk Res.* – 1993. – Vol. 17, № 4. – P. 353–358.
17. *Радиационная цитогенетика: русско-английский словарь-справочник/ Э.А. Дёмина и соавт.* – К.: Здоров'я, 2009. – 386 с.
18. *Wood K.D., Mitchell M., Lindahl T.* Human DNA repair genes // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 577, № 1–2. – P. 275–283.
19. *Гродзинський Д.М.* Радіобіологія. – К.: Либідь, 2000. – 448 с.
20. *Дьоміна Е.А.* Радіогенні цитогенетичні ефекти в учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС: Автореф. дис. докт. біол. наук. – К., 2002. – 36 с.
21. *Лучник Н.В.* Образование абераций хромосом при облучении клеток на разных стадиях митотического цикла // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 1973. – Т. 13, № 2. – С. 163–177.
22. *Дьоміна Е.А., Ворошчук О.М.* Закономірності утворення аберацій хромосом у соматичних клітинах людини залежно від дози опромінення // *Вісник товариства генетиків і селекціонерів.* – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 166–175.
23. *Петин В.Г., Сынзыныс Б.И.* Комбинированное действие факторов окружающей среды на биологические системы. – Обнинск: ИАТЭ, 1998. – 73 с.
24. *Liu Y., Huang H.* Involvement of calcium-dependent protein kinase C in arsenite-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells // *J. Cell Biochem.* – 1997. – Vol. 64, № 3. – P. 423–433.

Представлено Л.Л. Лукаш і М.А. Пілінською  
Надійшла 13.02.2013

## РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ АБЕРАЦИИ ХРОМОСОМ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ КО-МУТАГЕНОВ (ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)

Э.А. Демина, О.П. Пилипчук

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины  
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45  
e-mail: lena.pylypchuk@ukr.net

**Цель.** Определение формирования абераций хромосом в облученных соматических клетках человека в зависимости от дозы ионизирующей радиации и концентрации ко-мутагена. **Методы.** Использована тест-система культуры лимфоцитов периферической крови человека с метафазным анализом абераций хромосом. **Результаты.** В работе установлено явление ко-мутагенеза в условиях комбинированного действия облучения (0,3–2,0 Гр) и верапамила (1,5–4,0 мкг/мл) на хромосомном уровне лимфоцитов периферической крови человека (*in vitro*). Верапамил в концентрации 4,0 мкг/мл потенцирует повреждающее действие малых доз радиации ~ в 1,5 раза. В спектре индуцированных повреждений преобладают аберации хромосомного типа, частота которых возрастает с повышением концентрации ко-мутагена (1,5–4,0 мкг/мл). **Вывод.** В рамках выполненных модельных экспериментов сформулирован вывод, что подавление системы репарации под влиянием ко-мутагена является доминирующим механизмом в повышении частоты лучевых маркеров – абераций хромосомного типа.

**Ключевые слова:** ко-мутагенез, облучение, верапамил, радиационно-индуцированные аберации хромосом, соматические клетки человека.

RADIATION-INDUCED CHROMOSOME  
ABERRATIONS IN HUMAN LYMPHOCYTES  
UNDER THE EFFECT OF CO-MUTAGENS  
(RESEARCH *IN VITRO*)

*E.A. Dyomina, O.P. Pylypchuk*

R.E. Kavetsky Experimental Pathology, Oncology  
and Radiobiology Institute of the NAS of Ukraine  
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str., 45  
e-mail: lena.pylypchuk@ukr.net

**Aim.** The main aim of this paper is to determine the details of chromosome aberrations formation in irradiated human somatic cells depending on the dose of irradiation and concentration of co-mutagen. **Methods.** The test system of human peripheral blood lymphocytes in culture with metaphase analysis of chromosome aberrations was used. **Results.** In human peripheral blood lymphocytes (in vitro) we established

at chromosomal level the phenomenon of co-mutagenesis under conditions of combined action of radiation (0.3–2.0 Gy) and verapamil (1.5–4.0 µg/ml). Verapamil at a concentration of 4.0 mg/ml was shown to potentiate the damaging effects of low doses of radiation ~ 1.5 times. Frequency of chromosome type aberrations increased with the raising concentration of co-mutagen (1.5–4.0 µg/ml). **Conclusions.** Within performed model experiments it was revealed that inhibition of reparation system under the influence of co-mutagen is the dominant mechanism for increasing the frequency of radiation cytogenetic markers manifestation, such as chromosomal aberrations.

**Key words:** co-mutagenesis, irradiation, verapamil, radiation-induced chromosomal aberrations, somatic human cells.