

УДК 612.014.482:575.224.23

## **МОДИФИКАЦІЯ РАДІАЦІОННО-ИНДУЦІРОВАННИХ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Э.А. ДЕМІНА, Е.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.** Исследовать характер влияния аскорбиновой кислоты на формирование радиационно-индуцированных аберраций хромосом в иммунокомпетентных клетках человека *in vitro*. **Методы.** Тест-система культуры лимфоцитов периферической крови человека с метафазным анализом аберраций хромосом в первом постлучевом митозе. **Результаты.** В исследовании *in vitro* на хромосомном уровне лимфоцитов периферической крови человека при комбинации облучения (0,3–2,0 Гр) и действия аскорбиновой кислоты (20,0–80,0 мкг/мл) установлены радиопротекторные и ко-мутагенные эффекты препарата. Радиопротекторное действие аскорбиновой кислоты в терапевтической концентрации отмечается при облучении клеток в малых дозах, а ко-мутагенное – при облучении в высокой дозе за счет повышения частоты лучевых маркеров, и эффект зависит от периода клеточного цикла. **Выводы.** Модификация радиационно-индуцированных цитогенетических эффектов в культуре лимфоцитов периферической крови человека под влиянием аскорбиновой кислоты зависит от концентрации препарата, величины поглощенной дозы ионизирующих излучений, а также радиочувствительности клеток. Высокие концентрации аскорбиновой кислоты потенцируют повреждающее действие малых доз ионизирующих излучений.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, аскорбиновая кислота, аберрации хромосом, ко-мутагенные эффекты, соматические клетки человека.

**Введение.** Во всем мире, в том числе и в Украине, медицинские препараты интенсивно исследуются на генотоксичность [1–4], поскольку некоторые из них могут оказывать прессинг на геном человека [5]. При этом малоизученными остаются препараты с так называемым ко-мутагенным эффектом: не обладая собственной мутагенной активностью, они не выявляются при генотоксическом скрининге, но способны существенно усилить действие заведомо известных мутагенов [5–8]. Исследователи объективно отмечают, что интерпретация данных о радиопротекторных, ко-мутагенных и даже мутагенных эффектах некоторых препаратов, в том числе витаминов-антиоксидантов, полученных на экспериментальных животных, «неправомерна при экстраполяции на человека» [9]. К наиболее распространенным в медицинской практике препаратам-антиоксидантам относят аскорбиновую кислоту (АК), которую обозначают «сигнальной молекулой, вызывающей специфическую активность в

© Э.А. ДЕМІНА, Е.П. ПИЛИПЧУК, 2014

клетках» [10]. В ряде исследований выявлено неоднозначный характер действия АК на клетки человека [11–14]. Установлено, что в отличие от животных в организме человека АК не продуцируется, а ее пищевой дефицит способствует развитию рака желудка, пищевода, ротовой полости, шейки матки [11]. Существует противоположное мнение, согласно которому витамины, в том числе АК, целесообразно использовать с профилактической целью для снижения канцерогенного риска [14]. Данные об антимутагенности АК не всегда подтверждаются даже в методически близких исследованиях [6].

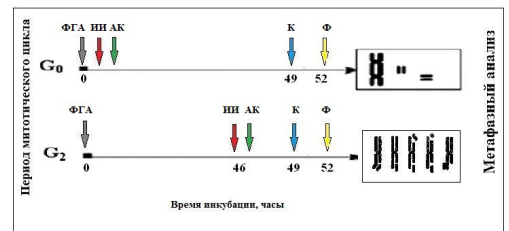
В связи со сложившейся экологической ситуацией в постчернобыльском периоде, вероятностным развитием канцерогенных эффектов малых доз ионизирующих излучений (ИИ) и онкогенной опасностью повышенного уровня хромосомных изменений в клеточных популяциях исследование характера воздействия АК на формирование радиационно-индуцированной нестабильности генома соматических клеток человека является актуальным.

Цель работы: исследовать характер влияния АК на формирование радиационно-индуцированных аберраций хромосом в иммунокомпетентных клетках человека *in vitro*.

### Материалы и методы

В работе использована тест-система лимфоцитов периферической крови (ЛПК), которые относятся к классу вегетативных интермитотических клеток, то есть наиболее радиочувствительных соматических клеток человека [15]. Венозную кровь 7 условно здоровых доноров культивировали полумикрометодом [16] с некоторыми модификациями на протяжении 52 ч. В работе руководствовались положением Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2008), которая

предусматривает информированное согласие доноров на участие в исследовании. Алгоритм исследования представлен на рис. 1. Облучение культуры ЛПК осуществляли в G<sub>0</sub>- и G<sub>2</sub>- периодах клеточного цикла (на 0 и 46 ч. инкубации клеток, соответственно) на рентгеновской установке «РУМ–17». Условия облучения: сила тока составляла 10 мА, напряжение – 200 кВ, фильтр Cu (0,5 мм), мощность дозы – 0,89 Гр/мин., диапазон исследованных доз 0,3 – 2,0 Гр. В качестве модификатора лучевых эффектов использовали АК, которую вводили в культуру ЛПК сразу после облучения в диапазоне концентраций 20,0–80,0 мкг/мл крови, что соответствовало терапевтической концентрации, а также в 2 и 4 раза превышающую её. Метафазный анализ клеток осуществляли в первом постлучевом митозе. На каждое наблюдение анализировали в среднем 200–300 метафаз. В качестве показателя пролиферативной активности лимфоцитов использовали значение митотического индекса, для чего определяли количество клеток, находящихся на стадии митоза. Математическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли стандартными методами с использованием программы Excel [17].



**Рис. 1.** Алгоритм исследования ко-мутагенных свойств аскорбиновой кислоты. ФГА – митоген, ИИ – ионизирующее излучение, АК – аскорбиновая кислота, К – колхицин, Ф- фиксация клеток

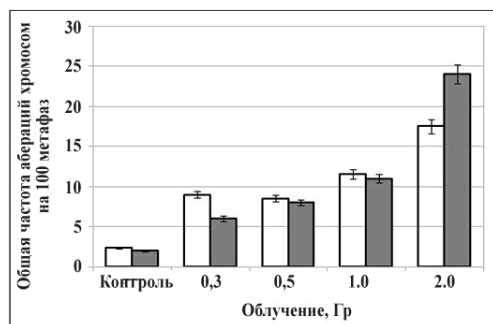
Данный методический подход (рис. 1) позволяет моделировать гипотетические ситуации при комбинированном воздействии ИИ и препаратов с возможной ко-му-

тагенной активностью на хромосомном уровне ЛПК человека.

### Результаты и обсуждение

Показано, что АК в интервале исследованных концентраций (20,0–80,0 мкг/мл) не влияет на величину спонтанного уровня aberrаций хромосом в лимфоцитах доноров, которая соответствует среднепопуляционным значениям ( $2,0 \pm 0,86$  на 100 метафаз). Результаты согласуются с данными работы [18], в которой показано отсутствие влияния витаминов-антиоксидантов на спонтанный мутационный процесс в лимфоцитах человека.

При анализе частоты повреждений хромосом, индуцированных при облучении ЛПК в  $G_0$ -периоде клеточного цикла (в диапазоне доз 0,3–2,0 Гр) и постлучевом воздействии АК (в интервале концентраций 20,0–80,0 мкг/мл), модифицирующий эффект данного препарата был неоднозначным (рис. 2).



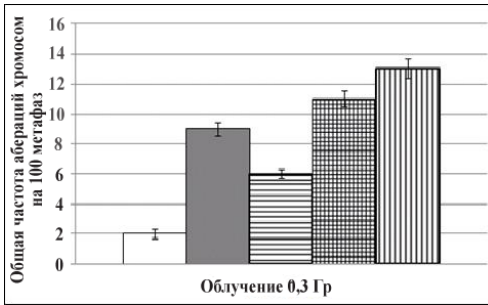
**Рис. 2.** Общая частота aberrаций хромосом в культуре ЛПК при комбинированном действии облучения и АК в терапевтической концентрации 20,0 мкг/мл. □ – облучение ЛПК в  $G_0$ -периоде клеточного цикла, ■ – облучение ЛПК в  $G_0$ -периоде клеточного цикла + АК 20,0 мкг/мл

При сочетанном воздействии ИИ в малой дозе (0,3 Гр) и АК в терапевтической концентрации (20,0 мкг/мл) отмечается уменьшение общей частоты aberrаций хромосом  $\sim 1,5$  раза по сравнению с эффектом облучения. Это согласуется с вы-

водами работы, выполненной на растительных объектах [19], согласно которым АК в терапевтических дозах проявляет радиопротекторные свойства путем утилизации свободных радикалов и повышения антиоксидантного статуса клеток. При облучении ЛПК в относительно высокой дозе (2,0 Гр) под влиянием АК в той же концентрации отмечается потенцирование мутагенного эффекта – повышение общей частоты aberrаций хромосом  $\sim 1,4$  раза за счет aberrаций хромосомного типа, что свидетельствует о ко-мутагенных свойствах препарата. Наблюдаемое потенцирование радиационно-индуцированного цитогенетического эффекта происходит за счет лучевых маркеров – дицентриков (10/100 метафаз, по сравнению с облучением – 5/100 метафаз). Поскольку для формирования обменных aberrаций – дицентриков требуются локальные двойные разрывы хромосом, являющиеся следствием облучения, то повышенный выход aberrаций данного типа при дополнительном действии АК можно интерпретировать, как доказательство усиления реализации первичных лучевых повреждений под влиянием исследованного препарата. Полученные эффекты, согласно данным работы [20], могут быть следствием кластерного действия на геном человека.

Отдельного внимания заслуживает модификация цитогенетических эффектов малых доз ИИ при действии АК в концентрациях, превышающих значение терапевтической. Установлено, что дополнительное постлучевое действие АК в концентрациях 40,0 и 80,0 мкг/мл увеличивает общую частоту aberrаций хромосом по сравнению с эффектом облучения в дозе 0,3 Гр  $\sim 1,4$  раза (рис. 3). Это может свидетельствовать о ко-мутагенной активности АК в диапазоне относительно высоких концентраций. Поскольку облучение в малых дозах наряду с разрывами хромосом может индуцировать предмутационные

потенциальные изменения в них, то дополнительное действие ко-мутагенов в высокой концентрации может способствовать их реализации в структурные перестройки хромосом, в том числе за счет угнетения ферментов репарации [21].



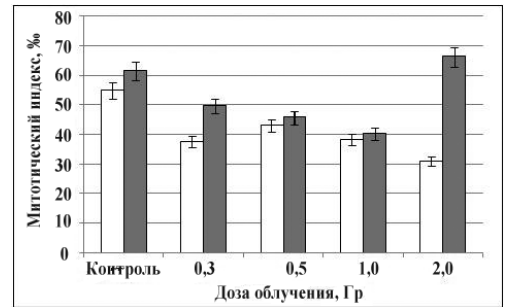
**Рис. 3.** Общая частота aberrаций хромосом в культуре ЛПК при комбинированном действии малых доз ИИ (0,3 Гр) и АК в концентрациях 20,0–80,0 мкг/мл. □ – контроль, ■ – облучение, ▨ – облучение + АК 20,0 мкг/мл, ▩ – облучение + АК 40 мкг/мл, ▪ – облучение + АК 80,0 мкг/мл

Можно заключить, что антиоксидант АК в зависимости от концентрации при облучении клеток в малых дозах может проявлять как радиопротекторное, так и ко-мутагенное действие.

Эти результаты коррелируют с данными, опубликованными нами ранее [8], согласно которым медицинский (кардиологический) препарат верапамил в относительно высоких концентрациях способен проявлять ко-мутагенную активность, потенцируя повреждающее действие малых доз ИИ за счет повышения общей частоты aberrаций хромосом ~ в 1,5 раза.

Анализ пролиферативной активности ЛПК в условиях сочетанного действия облучения (0,3–2,0 Гр) и АК (20,0 мкг/мл) в G<sub>0</sub>-периоде клеточного цикла показал следующее. Наиболее выраженное угнетение митотической активности клеток отмечалось при облучении в дозе 2,0 Гр, а дополнительное действие АК в терапевтической концентрации, наоборот, повышало ее ~ в 2 раза, превышая даже значение

интактного контроля (рис. 4). Полагаем, что данный эффект обусловлен “снятием” радиационно-индуцированного блока (задержки митоза) под влиянием данного препарата, что сокращает время репарации первичных повреждений. Это подтверждается повышением общей частоты aberrаций хромосом в данных условиях эксперимента (рис. 2).



**Рис. 4.** Комбинированное действие облучения (0,3–2,0 Гр) и АК (20,0 мкг/мл) на митотическую активность ЛПК. □ – облучение ЛПК в G<sub>0</sub>-периоде клеточного цикла, ■ – облучение ЛПК в G<sub>0</sub>-периоде клеточного цикла + АК 20,0 мкг/мл

Определенный научный интерес представляет исследование ко-мутагенной активности данного препарата в зависимости от радиочувствительности клеток. В этой связи нами выполнены аналогичные эксперименты в наиболее радиочувствительном G<sub>2</sub>-периоде клеточного цикла лимфоцитов в культуре (рис. 1). Показано, что при облучении ЛПК в дозе 0,3 Гр препарат АК в терапевтической концентрации, так же как и в опытах в G<sub>0</sub>-периоде, оказывает радиопротекторное действие (снижение общей частоты aberrаций хромосом ~ в 1,4 раза по сравнению с эффектом облучения). Но ко-мутагенный эффект в G<sub>2</sub>-периоде проявляется на дозовой кривой ранее по сравнению с G<sub>0</sub>-периодом, начиная уже с дозы 1,0 Гр (12,0±1,1 и 18,0±1,4, соответственно; то есть потенцирование эффекта ~ в 1,5 раз), что обусловлено более высокой радиочувстви-

тельностью клеток в этом периоде клеточного цикла.

Модификация радиационно-индуцированных цитогенетических эффектов в культуре ЛПК человека под влиянием АК зависит от концентрации препарата, величины поглощенной дозы ИИ, а также радиочувствительности клеток. Существенная роль в формировании ко-мутагенных эффектов принадлежит влиянию АК на продолжительность радиационно-индуцированных блоков, и таким образом на пролиферативный потенциал клеток.

### Выводы

Исследованы закономерности формирования радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови человека в условиях модифицирующего действия аскорбиновой кислоты. Ко-мутагенные эффекты препарата наиболее выражены при облучении соматических клеток человека в относительно высокой дозе за счет повышения частоты лучевых маркеров и зависят от периода клеточного цикла. Высокие концентрации аскорбиновой кислоты потенцируют повреждающее действие малых доз ионизирующих излучений.

### Список литературы

1. Jackson M.A., Stack H.F., Waters M.D. Genetic activity profiles of anticancer drugs // *Mutation Res.* – 1996. – Vol. 355. – P. 171–208.
2. Ревазов Ю.А., Дурнев А.Д. Оценка мутагенности новых лекарств. Мед. Рекомендации. – М.: Фармакол.комитет МЗРФ, 1994. – 20 с.
3. Барияк І.Р., Невмержицька Л.В., Дуган О.М. Методичні рекомендації з оцінки мутагенних властивостей нових лікарських засобів. – К.: Фармакологічний комітет МОЗ України, 1996. – 32 с.
4. Witt K.L., Bishop J.B. Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells // *Mutation Res.* – 1996. – Vol. 355. – P. 209–234.
5. Сердюк А.М., Тимченко О.І., Гойда Н.Г. та ін. Генотонді і здоров'я населення: методологія оцінки ризику від мутагенів довкілля, напрямки профілактики генетично обумовленої патології. – Київ: ІГМЕ АМН України, 2003. – 191 с.
6. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Комутагенез – новое направление исследований генотоксикологии // *Бюлл. эспер. биол. мед.* – 2003 – Т. 135. – С. 604–612.
7. Molento M. et al. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxectin in sheep // *Parasitol. Res.* – 2004. – Vol. 92, – P. 121–127.
8. Дьоміна Е.А., Пилипчук О.П. Радіаційно-індуковані аберації хромосом в лімфоцитах людини за дії ко-мутагенів (дослідження *in vitro*) // *Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів.* – К. 2013. – Т.11, № 3. – С. 46–51.
9. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. – М.: Медицина, 1998. – 328 с.
10. Свергун В.Т., Коваль А.Н. Динамика изменения содержания аскорбиновой кислоты у крыс при внешнем облучении / *Матер. междунар. науч. конф.*, 26–27 сентября 2013 г. – Минск: Ин-т радиологии, 2013. – С. 143–144.
11. Mirvish S.S. Effects of vitamin C and E on N-nitrosocompound formation, carcinogenesis, and cancer // *Cancer.* – 1986. – №58. – P. 1842–1858.
12. Shamberger R.J. Genetic toxicology of ascorbic acid // *Mutat Res.* – 1984. – Vol.133. – № 2. – P. 135–59.
13. Anderson D. et al. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxicity assays // *Mutat Res.* – 1995. – Vol. 329. – № . P 37–47.
14. Заридзе Д.Г. Профилактика рака. Руководство для врачей. – М.: ИМА–ПРЕСС, 2009. – 224 с.
15. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. – М.: Медицина, 1991. – 494 с.
16. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. – Vienna: IAEA, 2011. – 232 p.
17. 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.
18. Дурнев А.Д., Сиднева Е.С., Жанатаев А.К. и др. Защитное действие витаминов при индуцированном мутагенезе // *Вестник РАМН.* – 2007, № 7. – С. 6 – 13.
19. Jagetia G.C. Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2007. – Vol. 40. – P. 74–81.
20. Копораска М., Rogolinski J. Clastogenic effects in human lymphocytes exposed to low and high dose rate X-ray irradiation and vitamin C // *Nukleonika.* – 2011. – Vol. 56. – № 4. – P. 253–257.

21. McNeill D.R. et al. Lead promotes abasic site accumulation and co-mutagenesis in mammalian cells by inhibiting the major abasic endonuclease // Ape1. Mol. Carcinog. – 2007. – Vol. 46. – P 91–99.

Представлена Л.Л. Лукаш  
Поступила 15.04.2014

МОДИФІКАЦІЯ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИХ ЕФЕКТИВ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПІД ВПЛИВОМ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

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.** Дослідити характер впливу аскорбінової кислоти на формування радіаційно-індукованих аберацій хромосом в імуннокомпетентних клітинах людини *in vitro*. **Методи.** Тест-система культури лімфоцитів периферичної крові людини з метафазним аналізом аберацій хромосом. **Результати.** У дослідженні *in vitro* на хромосомному рівні лімфоцитів периферичної крові людини при комбінації опромінення (0,3–2,0 Гр) і дії аскорбінової кислоти (20,0–80,0 мкг/мл) встановлені радіопротекторні і ко-мутагенні ефекти препарату. Радіопротекторна дія аскорбінової кислоти в терапевтичній концентрації відзначається при опроміненні клітин в діапазоні малих доз опромінення, а ко-мутагенну – при опроміненні у високій дозі за рахунок підвищення частоти променевиx маркерів, і залежить від періоду клітинного циклу. **Висновки.** Модифікація радіаційно-індукованих цитогенетических ефектів в культурі лімфоцитів периферичної крові людини під впливом аскорбінової кислоти залежить від концентрації препарату, величини поглиненої дози іонізуючих випромінювань, а також радіочутливості клітин. Високі концентрації аскорбінової кислоти потенціюють пошкоджувальну дію малих доз іонізуючих випромінювань

**Ключові слова:** іонізуюче випромінювання, аскорбінова кислота, аберації хромосом, ко-мутагенні ефекти, соматичні клітини людини.

MODIFICATION OF RADIATION-INDUCED CYTOGENETIC EFFECTS IN HUMAN LYMPHOCYTES BY THE ACTION OF ASCORBIC ACID

E.A. Dyomina, E.P. Pylypchuk

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

**Aim.** Aim is to investigate nature of the effect of ascorbic acid on the formation of radiation-induced chromosome aberrations in human immunocompetent cells *in vitro*. **Methods.** Test system of culture of human peripheral blood lymphocytes with metaphase analysis of chromosome aberrations in the first post-radiation mitosis. **Results.** Radioprotective and co-mutagenic effects were found in combined action of radiation exposure (0,3 – 2,0 Gy) and ascorbic acid (20,0–80,0 µg/ml) action at chromosomal level in lymphocytes of peripheral human blood *in vitro*. Ascorbic acid radioprotective effect at a therapeutic level was observed upon irradiation at low doses while co-mutagenic effect made itself felt upon irradiation at high doses due to increased frequency of the radiation markers and depended on the period of the cell cycle. **Conclusion** Modification of radiation-induced cytogenetic effects in cultures of human peripheral blood lymphocytes under the influence of ascorbic acid is dependent on the concentration of the drug, the absorbed dose of radiation, as well as cell radiosensitivity. It could be concluded that high concentrations of ascorbic acid potentiate the damaging effect of low doses of ionizing radiation

**Key words:** ionizing radiation, ascorbic acid, chromosomal aberrations, co-mutagenic effects, somatic human cells.