

МОДИФІКАЦІЯ РАДІОЧУТЛИВОСТІ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ ПІД ВПЛИВОМ КОМУТАГЕНІВ (радіобіологічне дослідження)

Дьоміна Е.А., Пилипчук О.П.

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

РЕЗЮМЕ. У роботі вперше встановлено, що комутагени верапаміл і аскорбінова кислота можуть істотно впливати на радіочутливість онкологічних хворих, підвищуючи частоту радіаційно-індукованих аберацій хромосом у немалігнізованих клітинах (лімфоцитах крові). До механізмів формування комутагенних ефектів належать процеси хромосомної, мікросателітної нестабільності, а також апоптоз. Отримані радіобіологічні дані доцільно враховувати під час призначення онкологічним хворим препаратів із комутагенною активністю в процесі променевого лікування.

Ключові слова: комутагени, нестабільність геному, апоптоз, лімфоцити периферичної крові, онкологічні хворі.

ВСТУП

Підвищення ефективності терапевтичного опромінення пухлин пов'язують не тільки з впровадженням у клініку високотехнологічної радіотерапевтичної апаратури, але і з проблемою цілеспрямованої модифікації променевих ефектів – підвищенням радіочутливості пухлинних клітин та підсиленням радіорезистентності здорових тканин. Дослідження радіочутливості нормальних і пухлинних клітин, а також організму хворих у цілому є особливо актуальним у зв'язку з підвищенням онкологічної захворюваності серед населення в регіонах, що постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи [3]. Змінився патогенез онкологічних захворювань, перебіг яких відрізняється більшою агресивністю та схильністю до генералізації процесу вже у період виявлення патології. Реакція пухлин на опромінення проявляється як їх регресія або досягається «контроль над локальним ростом пухлини» [1].

Незважаючи на використання оптимальної конформної променевої терапії в зону опромінення потрапляє певна частина здорових тканин: через те що злоякісні пухлини утворюють у здорових тканинах мікроінфільтрати, то ці ділянки також включають у зону опромінення; здорові тканини (наприклад, м'які, судини) зазнають опромінення в такій самій дозі, що і пухлина; і нарешті, здорові структури здорових тканин, що розташовані на вході та виході пучка іонізуючого випромінювання (ІВ), зазнають також опромінення. Тому променева

терапія має враховувати прийнятний ризик розвитку ранніх та віддалених побічних ефектів [10].

Опромінення здорових органів і тканин у процесі променевої терапії первинного раку приблизно в 10 % випадків може бути причиною розвитку радіаційного канцерогенезу – вторинних пухлин. Протягом перших 10 років після променевого або хіміопроменевого лікування розвиваються в основному лейкози; в більш віддалені терміни – солідні пухлини, частота яких підвищується зі збільшенням тривалості життя хворих.

Стандартна система класифікації радіаційних ефектів дозволяє оцінити ступінь важкості променевих ускладнень від 0 (ускладнення відсутні) до 5 (летальний ефект): ускладнення I ступеня (легкі) є оборотними і минають без терапевтичного втручання і переривання курсу опромінення; ускладнення II ступеня (помірні) виліковуються амбулаторно без зниження дози і переривання курсу опромінення; ускладнення III ступеня (важкі, з вираженою симптоматикою), при яких хворі потребують госпіталізації та інтенсивної терапії з перериванням курсу опромінення або зміною дози; ускладнення IV ступеня, що загрожують життю хворого та потребують відміни променевої терапії.

Сьогодні в променевій практиці не враховують варіабельність ефективності і швидкості процесів відновлення, і, як наслідок, «стандартна доза» ІВ може виявитися недостатньою

ою для пацієнтів із радіорезистентними пухлинами і водночас може зумовити високий ризик розвитку ускладнень у здорових тканинах пацієнтів із радіочутливим генотипом. Докази на користь існування різної радіочутливості клітин як детермінанти реакції здорової тканини на терапевтичне опромінення отримані в дослідженнях [14]. Розраховано, що 5% найбільш радіочутливих індивідуумів серед онкологічних хворих «обмежують» безпечний рівень впливу призначеної дози ІВ, що ставить під сумнів ефективність лікування. Ступінь ураження клітин, тканин таких хворих корелює з віддаленими променевими ускладненнями. Виявлення пацієнтів із радіочутливим генотипом за допомогою інформативних радіобіологічних методів і з урахуванням їх індивідуальної радіочутливості [2] дозволить більш ефективно проводити променеву терапію при високих дозах ІВ, а також із використанням радіомодифікаторів. Серед потенційних радіомодифікаторів поза увагою залишаються комутагени, які, не проявляючи мутагенної активності, можуть суттєво підсилювати ефекти хімічних мутагенів [5]. Небезпеку становлять деякі фармакологічні засоби, які в комбінації з іншими чинниками хімічної природи можуть проявляти комутагенну активність. Досліджено, що антагоніст кальцію верапаміл (Вп) підсилює бластогенну дію блеоміцину. Антиокси-дант аскорбінова кислота (АК) підсилює цитогенетичні ефекти циклофосфаміду в лімфоцитах людини [9].

Нещодавно нами отримано радіобіологічні факти стосовно якісних та кількісних особливостей формування генетичної нестабільності в опромінених клітинах крові здорових осіб під впливом комутагенів АК та Вп. Встановлено, що досліджені препарати здатні формувати комутагенні ефекти в лімфоцитах крові здорових осіб за дії малих доз ІВ [7, 8]. Сучасна клінічна радіобіологія оперує широким спектром даних щодо шляхів реалізації та механізмів дії модифікаторів променевих ефектів, але вплив комутагенів на формування радіаційно-індукованих пошкоджень у немалігнізованих клітинах онкологічних хворих залишається відкритим.

Відомо, що пухлина в процесі онкогенезу впливає на нормальні клітини, тканини, органи та регуляторні системи організму, нав'язуючи їм особливості власного метаболізму. Саме тому кров та її компоненти, які несуть інформацію про загальний фізіологічний стан організму, визнані як інформативна тест-система в сучасній онкології. У цій площині тест-система

культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) людини з наступним аналізом аберацій хромосом рекомендована міжнародними профільними організаціями для виконання не тільки біодозиметричних досліджень, але й оцінки характеру дії та ефективності радіомодифікаторів. Окрім того, лімфоцити є «індикаторними» клітинами як найбільш чутливі до дії ІВ і відображають радіочутливість організму людини в цілому.

Вищезазначене аргументує **мету роботи** – визначення впливу комутагенів на формування нестабільності геному в ЛПК онкологічних хворих.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використана тест-система культури ЛПК 24 первинних онкологічних хворих. У роботі керувались положенням Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2008), яка передбачає інформовану згоду донорів на участь у дослідженнях. Використано такі методи: цитогенетичні, молекулярно-генетичні, імуноцитохімічні та методи математичної статистики. Культивування ЛПК здійснювали за модифікованим методом [6]. Культуру лімфоцитів опромінювали на рентгєнівській установці «РУМ-17» у дозі 0,3 Гр при потужності дози 0,89 Гр/хв. Як комутагени використано Вп та АК в терапевтичній концентрації: Вп – 1,0 мкг/мл крові, АК – 20,0 мкг/мл крові; та у концентраціях, що перевищують її значення в 4 рази. Метафазний аналіз хромосом виконували за загальноприйнятими критеріями. Для дослідження мікросателітної нестабільності ДНК лімфоцитів крові онкологічних хворих виконували методом полімеразно-ланцюгової реакції. Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,7% агарозному гелі. Розмір ампліконів визначали за допомогою маркерів молекулярної ваги Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus з діапазоном 100-3000 п.н. (МВІ Fermentas, Литва). Для дослідження процесів апоптозу в ЛПК виконували подвійне імуноцитохімічне забарвлення антитілами до маркера апоптотичних ядер каспази-3 та флуоресцентного ядерного барвника Hoechst 33342. Аналіз забарвлених ЛПК проводили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа FluoView FV1000 (Olympus Inc., США). Статистичну обробку отриманих експериментальних даних проводили стандартними методами з використанням програми Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати цитогенетичного обстеження первинних онкологічних хворих показали, що спонтанний рівень хромосомних перебудов перевищував значення показників спонтанного рівня аберацій хромосом у лімфоцитах здорових осіб і варіював у межах від $5,0 \pm 0,7$ до $11,0 \pm 1,1$ аберацій на 100 метафаз залежно від стадії захворювання. Середньогрупове значення спонтанного рівня аберацій хромосом у ЛПК онкологічних хворих становило $7,0 \pm 0,8$ на 100 метафаз. Підвищений рівень цитогенетичних перебудов у лімфоцитах крові хворих, які виникають унаслідок порушення роботи захисних систем організму, а саме репарації, апоптозу, свідчить про нестабільність геному в цілому і може бути додатковим критерієм при ризику онкологічних захворювань [12].

Встановлено, що Вп та АК у досліджених концентраціях істотно не впливають на величину і спектр. Тому дані препарати можуть бути «кандидатами» в комутагени при дослідженні їх дії на опромінені немалігнізовані клітини крові онкологічних хворих.

Результати модифікуючої дії Вп (1,0 і 4,0 мкг/мл) на опроміненні (0,3 Гр) ЛПК онкологічних хворих були неоднозначними та залежали від концентрації препарату. Під впливом Вп у концентрації 1,0 мкг/мл рівень радіаційно-індукованих пошкоджень хромосом знижувався в 1,3 рази (рис. 1). Але підвищення концентрації Вп до 4,0 мкг/мл, навпаки, зумовило зростання загальної частоти хромосомних перебудов порівняно з променевим ефектом в 1,2 рази (рис. 1). Таким чином, із підвищенням

концентрації препарат Вп здатний проявляти комутагенну активність в опроміненіх немалігнізованих клітинах онкологічних хворих.

Для з'ясування механізмів формування комутагенних ефектів Вп проведено імуноцитохімічний аналіз дослідження процесів апоптозу шляхом ідентифікації каспази-3. Показано, що при опроміненні в малій дозі та додатковій дії Вп у концентраціях 1,0 та 4,0 мкг/мл на лімфоцити крові онкологічних хворих найбільша кількість каспаз-3-позитивних ядер даних клітин спостерігається за дії комутагену в концентрації 1,0 мкг/мл (рис. 2).

Вважаємо, що внаслідок комбінованої дії ІР (0,3 Гр) та Вп (1,0 мкг/мл) частина ЛПК, ядра яких найбільш навантажені структурними пошкодженнями, елімінується шляхом апоптозу, і, як результат, зменшується кількість клітин з абераціями хромосом порівняно з ефектом опромінення (рис. 1). Зниження рівня радіаційно-індукованих хромосомних перебудов під впливом Вп (1,0 мкг/мл) пов'язано з активацією каспази-3, яка, у свою чергу, запускає каскад реакцій, результатом яких є апоптична загибель клітин [4]. Оскільки апоптоз ініціюється за рахунок підвищеного рівня іонів кальцію в клітині, то Вп (4,0 мкг/мл) інгібує надходження кальцію в клітині, за рахунок чого кількість каспаз-позитивних ядер в опроміненіх ЛПК знижується порівняно із ефектом Вп. У даному випадку це зумовлює підвищення рівня аберацій хромосом, тобто формування комутагенного ефекту (рис. 2).

АК на відміну від Вп в опроміненіх клітинах онкологічних хворих проявляла лише комута-

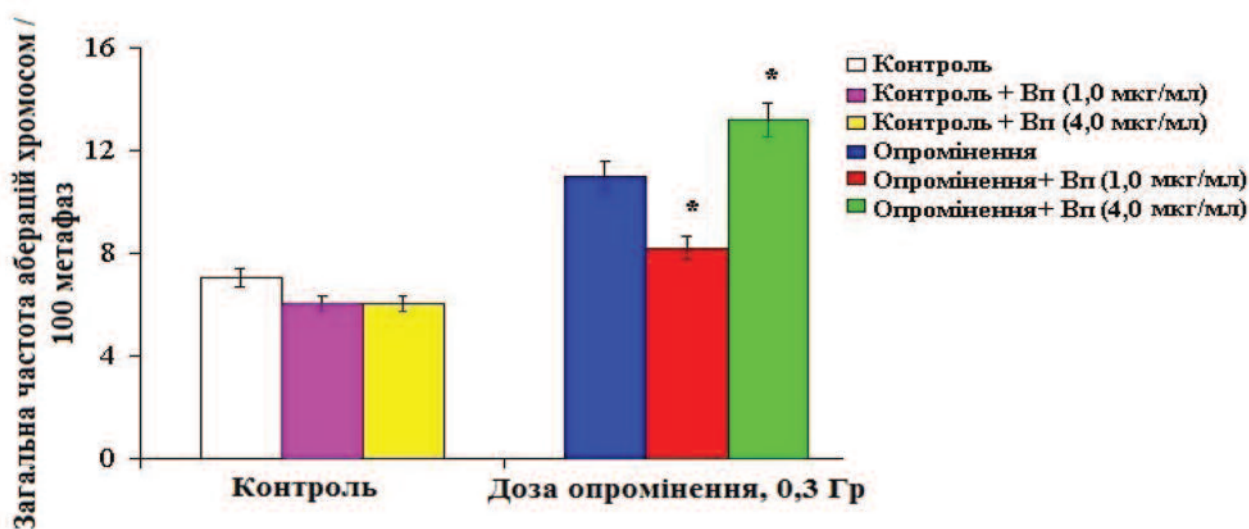


Рис. 1. Комбінований вплив ІР (0,3 Гр) і Вп (1,0; 4,0 мкг/мл) на частоту індукованих аберацій хромосом у ЛПК онкологічних хворих. * – $p \leq 0,05$ порівняно з променевим ефектом

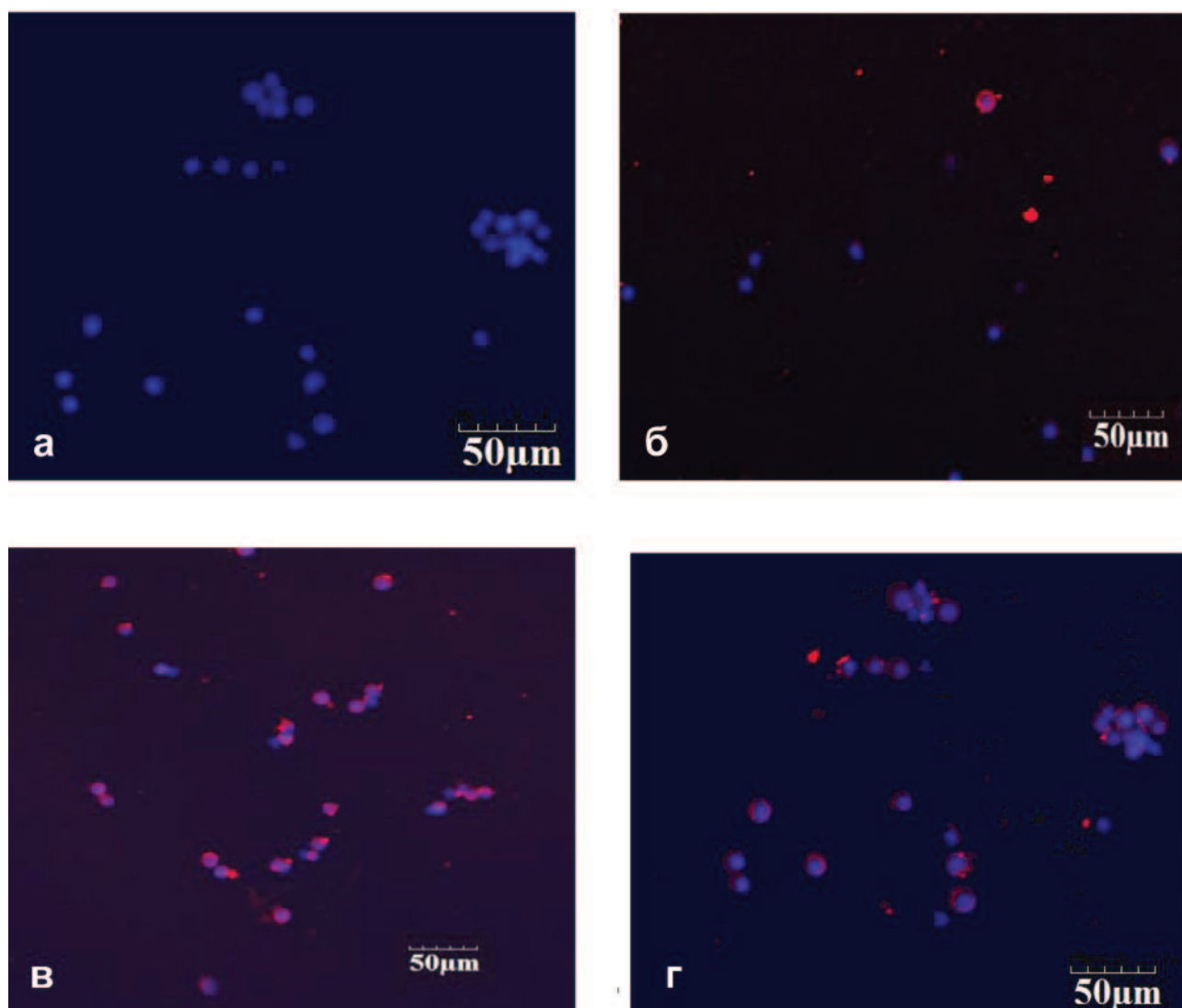


Рис. 2. Мікрофото імуноцитохімічно забарвлених лімфоцитів крові онкологічних хворих: А – інтактний контроль; Б – опромінення в дозі 0,3 Гр; В – комбінована дія опромінення та Вр (1,0 мкг/мл); Г – комбінована дія опромінення та Вр (4,0 мкг/мл)

генну активність. При опроміненні *in vitro* лімфоцитів крові хворих у дозі (0,3 Гр) і додатковій дії АК (20,0 і 80,0 мкг/мл) встановлено комутагенний ефект – підвищення частоти аберацій в 1,7-1,4 раза порівняно з променевим ефектом ($19,0 \pm 0,5$ та $15,0 \pm 0,7$ проти $11,0 \pm 0,4$) (рис. 3). Комутагенний ефект АК формується в основному за рахунок аберацій хромосомного типу.

Беручи до уваги тісний зв'язок між розвитком злоякісного процесу та мікросателітною нестабільністю ДНК [13], досліджено вплив комутагену АК (20,0 та 80,0 мкг/мл) на формування мікросателітної нестабільності ДНК в опроміненних немалігнізованих клітинах онкологічних хворих. ISSR-ПЛР аналіз зразків крові первинних онкологічних хворих показав, що

4 праймери із 6 досліджених виявилися мультиморфними $(GA)_9C$; $(AC)_8G$; $(AC)_8C$; $(GACA)_4$ до комбінованої дії малих доз ІР (0,3 Гр) та АК (20,0; 80,0 мкг/мл). Відмінності між досліджуваними зразками крові хворих виявились при використанні двох інших праймерів, що містили повтор $(AG)_8$ (рис. 4). Встановлено, що у підтримці стабільності геному важливу роль виконує система репарації неканонічних пар нуклеотидів у ДНК («mismatch repair») [11]. Відмінності в паттернах фрагментів ампліфікації з праймерами $(AG)_8T$ та $(AG)_8CT$ порівняно з контрольними показниками вказують на вплив комутагену АК на реорганізацію нуклеотидної послідовності ДНК.

Через те що стабільність мікросателітної ДНК визначається реплікаційними та репара-

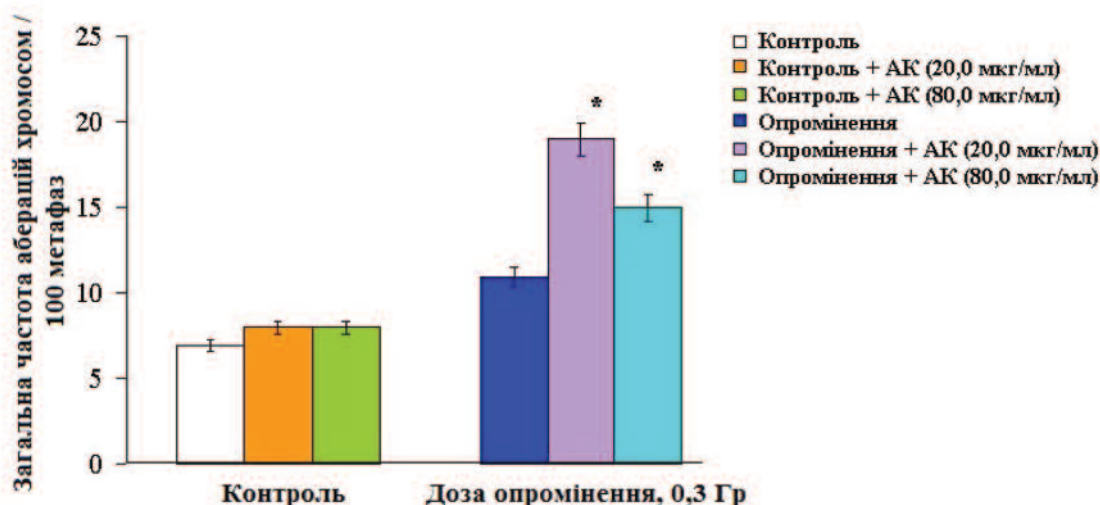


Рис. 3. Комбінований вплив ІВ (0,3 Гр) і АК (20,0; 80,0 мкг/мл) на частоту індукованих аберацій хромосом у ЛПК онкологічних хворих. * – $p \leq 0,05$ порівняно з променевим ефектом

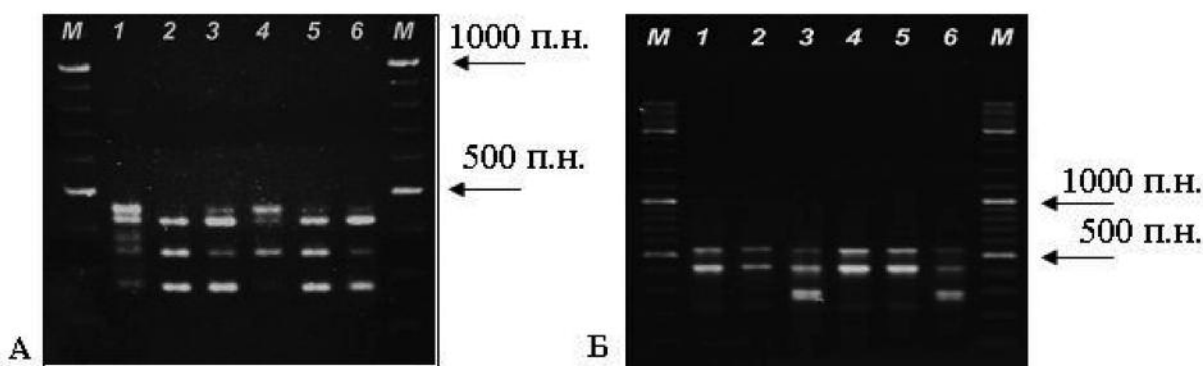


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК, виділеної з венозної крові первинних онкологічних хворих із праймерами до мікросателітних повторів: А — $(AG)_8CT$; Б — $(AG)_8T$

ційними процесами, мутаційними подіями та модифікацією ДНК, можна стверджувати, що комбінована дія малих доз ІВ та комутагенів сприяє підвищенню нестабільності геному. Отже, комутагени здатні підсилювати пошкоджуючу дію ІВ шляхом пригнічення роботи «mismatch» репарації.

Відомо, що підвищення рівня генетичних змін у клітинних популяціях є потенційно онкогенним [12], а комутагени (як показано в нашому дослідженні) підвищують радіочутливість організму онкологічних хворих. Тому варто звернути увагу спеціалістів у галузі радіаційної онкології, що призначення хворим препаратів із комутагенними властивостями у процесі терапевтичного опромінення може слугувати промотором розвитку вторинних пухлин радіаційного генезу.

ВИСНОВКИ

Вперше встановлено формування комутагенних ефектів у клітинах онкологічних хворих, які залежать від концентрації препаратів та специфіки їх дії.

При опроміненні в малих дозах лімфоцитів крові первинних онкологічних хворих аскорбінова кислота в терапевтичній концентрації проявляє тільки комутагенні властивості, підвищуючи частоту аберацій хромосом в 1,7 раза. За аналогічних умов верапаміл в опроміненних лімфоцитах крові онкологічних хворих проявляє комутагенні властивості лише у високій концентрації (4,0 мкг/мл).

На підставі проведеного ISSR-ПЛР аналізу встановлено, що в механізмах формування комутагенних ефектів аскорбінової кислоти в опроміненних лімфоцитах крові первинних

онкологічних хворих певну роль відіграють порушення системи репарації помилково спарених нуклеотидів, що зумовлюють зміни у структурній організації ДНК.

В основі комутагенезу, що розвивається в опромінених клітинах онкологічних хворих, лежать процеси формування хромосомної, мікросателітної нестабільності геному та апоптоз.

ЛІТЕРАТУРА

1. Джойнер М.С., ван дер Когель О. Дж. Основы клинической радиобиологии. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. — 600 с
2. Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М. Індивідуальна радіочутливість людини. – К.: Логос, 2006. – 126 с.
3. Иванкова В.С., Дёмина Э.А. Проблемы радиорезистентности опухолей в радиационной онкологии. – К.: Здоров'я, 2012. – 190 с.
4. Мазуркевич Т.А., Аксенінко А.В. Апоптоз та його механізми (огляд) // Наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2013. – № 155. – С. 309-316.
5. Ashmawy I.M., Nahas A.F., Bayad A.E. Teratogenic and cytogenetic effects of ivermectin and its interaction with P-glycoprotein inhibitor // Research in veterinary science. – 2011. – V. 90, № 1. – P. 116-123.
6. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. — Vienna: IAEA, 2011. — 232 p.
7. Domina E., Pylypchuk O., Mikhailenko V. The Modifying effect of co-Mutagens on the frequen-

cy and spectrum of radiation-induced chromosome aberrations in human cells // Pharm. Anal. Acta. – 2015. – V. 6. – № 6. – P. 1-6.

8. Domina E.A., Pylypchuk O.P., Mikhaylenko V.M. Destabilization of human cell genome upon the combined effect of radiation and ascorbic acid // Experimental oncology. – 2014. – № 4. – P. 236-240.
9. Effects of Vitamin C on DNA Damage / B. Nikolic, J. Stanojevic, B. Vukovic-Gacic (et al.) // Food Technol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 44, № 4. – P. 449-456.
10. Jung H., Beck-Bornholdt HP., Svoboga V. et al. Quantification of late complications after radiation therapy // Radiother. Oncol. — 61. — P. 233-246.
11. Radian KD A., Burris C., Iliff N. DNA mismatch repair defects and microsatellite instability status in periocular sebaceous carcinoma // American journal of ophthalmology. – 2014. – Vol. 157, № 3. – P. 640-647.
12. Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients / S. Vodenkova, Z. Polivkova, L. Musak (et al.) // Mutagenesis. – 2015. – V. 30. – № 4. – P. 557-563.
13. Sinicrope F.A., Sargent D. J. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications // Clin. cancer res. – 2012. – Vol. 18, № 6. – P. 1506-1512.
14. Turesson I., Nyman J., Holmberg E., Oden A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients // International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. – 1996. – Vol. 36, Issue 5. – P. 1065-1075.

МОДИФИКАЦИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМУТАГЕНОВ (РАДИОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Дёмина Э.А., Пилюпчук Е.П.
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

РЕЗЮМЕ. В работе впервые установлено, что комутагены верапамил и аскорбиновая кислота могут существенно влиять на радиочувствительность онкологических больных, повышая частоту радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в немалигнизированных клетках (лимфоцитах крови). К механизмам формирования комутагенных эффектов относят процессы хромосомной, микросателітної нестабільності, а также апоптоз. Полученные радиобиологические данные целесообразно учитывать при назначении онкологическим больным препаратов с комутагенной активностью в процессе лучевого лечения.

Ключевые слова: комутагены, нестабильность генома, апоптоз, ЛПК, онкологические больные.

CANCER PATIENT RADIOSENSITIVITY MODIFICATION UNDER CO-MUTAGEN AFFECT (RADIOBIOLOGICAL RESEARCH)

Domina E., Pylypchuk O.
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv

SUMMARY. For the first time it found that the co-mutagens verapamil and ascorbic acid can significantly affect on the cancer patients radiosensitivity, increasing the frequency of radiation-induced chromosomal aberrations in nonmalignant cells (lymphocytes). The mechanisms of a co-mutagenic effects formation includes processes of chromosomal and microsatellite instability, apoptosis. These radiobiological data it is advisable to take into account while assigning drugs to cancer patients with co-mutagenic activity in the course of radiation treatment.

Keywords: co-mutagens, genome instability, apoptosis, peripheral blood lymphocytes, cancer patients.