

Е.А. Дьоміна<sup>1</sup>  
О.П. Пилипчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

<sup>2</sup>Лікувально-діагностичний центр «Діагностик», Київ, Україна

**Ключові слова:** комутагени, опромінені лімфоцити, онкологічні хворі, аберації хромосом, мікросателітна нестабільність.

## ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ЯВИЩА КОМУТАГЕНЕЗУ В ОПРОМІНЕНИХ КЛІТИНАХ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ

**Мета:** визначення особливостей формування радіаційно-індукованих аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини за умови комутагенної модифікації (дослідження *in vitro*). **Об'єкт і методи:** об'єктом дослідження були Т-лімфоцити периферичної крові 24 первинних онкогінекологічних хворих (група дослідження) та 67 умовно здорових осіб (група порівняння). Виділення, культивування лімфоцитів та метафазний аналіз радіаційно-індукованих аберацій хромосом виконували за стандартним протоколом. Відразу після рентгенівського опромінення комутагени вводили в культуру клітин у терапевтичних концентраціях (верапаміл — 1,0 мкг/мл крові, аскорбінова кислота — 20,0 мкг/мл крові), а також у концентраціях, що перевищували останні. Для дослідження мікросателітної нестабільності ДНК лімфоцитів використано метод полімеразно-ланцюгової реакції, для вивчення процесу апоптозу — імуноцитохімічний метод. Застосовано статистичні методи. **Результати:** встановлено, що аскорбінова кислота і верапаміл у терапевтичних концентраціях не впливали на вихідний рівень аберацій хромосом у неопроміненіх лімфоцитах хворих онкологічного профілю. З підвищенням концентрації верапамілу до 4,0 мкг/мл частота хромосомних перебудов зростала на 20%. Шляхом імуноцитохімічного аналізу встановлено, що під час опромінення низькою дозою (0,3 Гр) та додаткової дії верапамілу (1,0 та 4,0 мкг/мл крові) на лімфоцити крові хворих найбільша кількість каспаз-3-позитивних ядер спостерігається за дії комутагену в концентрації 1,0 мкг/мл. При опроміненні культури лімфоцитів і додатковій дії аскорбінової кислоти (20,0 і 80,0 мкг/мл) встановлено комутагенний ефект — статистично суттєве підвищення частоти аберацій (в 1,7–1,4 рази) порівняно з променевим ефектом. Уперше виявлено мікросателітну нестабільність ДНК внаслідок комутагенної дії аскорбінової кислоти на опромінені низькою дозою лімфоцити хворих. Цей факт може свідчити про порушення системи репарації помилково спарених нуклеотидів у клітинах циркулюючого пулу крові хворих. **Висновки:** при опроміненні (0,3 Гр) лімфоцитів крові хворих онкологічного профілю аскорбінова кислота проявляє комутагенні властивості в терапевтичній концентрації (20 мкг/мл), а верапаміл — у підвищеній концентрації (4,0 мкг/мл крові). З підвищенням концентрації аскорбінової кислоти (20,0; 40,0; 80,0 мкг/мл) та верапамілу (1,0; 1,5; 2,0 та 4,0 мкг/мл) здійснюють стимулювальний вплив на мітотичну активність опроміненіх лімфоцитів. Уперше встановлено, що в механізмах формування комутагенних ефектів аскорбінової кислоти в опроміненіх лімфоцитах крові хворих певну роль відіграють порушення системи репарації помилково спарених нуклеотидів, що зумовлюють зміни в структурній організації ДНК (мікросателітна нестабільність). В основі явища комутагенезу, що розвивається в опроміненіх лімфоцитах онкологічних хворих, лежать процеси формування хромосомної та мікросателітної нестабільності, апоптоз, стимуляція проліферації клітин.

З'ясування закономірностей формування явища комутагенезу в опроміненіх клітинах людини має фундаментальне та практичне значення, оскільки пов'язане з механізмами радіаційно-індукованого мутагенезу, канцерогенезу та формуванням генетичної нестабільності клітин [1–4]. Небезпека спо-

лук комутагенів полягає в тому, що, не проявляючи власної мутагенної активності, вони можуть суттєво модифікувати, а саме потенціювати ефекти деяких мутагенів хімічної природи [5]. Існує припущення, що комутагенні ефекти опосередковані декількома механізмами, але при цьому питання стосовно учас-

ті репараційних процесів у формуванні зазначених ефектів залишається відкритим. Такий стан зазначеної проблеми почасти можна пояснити тим, що препарати з комутагенними властивостями не виявляються при генотоксичному скринінгу, але при цьому здатні суттєво підсилювати вплив відомих хімічних мутагенів [6, 7]. Особливу небезпеку серед потенційних комутагенів становлять лікарські засоби, наприклад, блокатор кальцієвих каналів верапаміл (Вп) та антиоксидант аскорбінова кислота (АК). Прояв комутагенних властивостей Вп та АК спостерігали в дослідженнях з низкою агентів хімічної природи, у тому числі вермектином, миш'яком, цисплатином [8–10]. Поглиблене вивчення впливу комутагенів на радіочутливість соматичних клітин людини пов'язане з Чорнобильською катастрофою, внаслідок якої хронічне низькодозове опромінення — екологічний фактор, який постійно справляє вплив на окремих радіаційно забруднених територіях, що призводить до дестабілізації геному людини [1]. Це також стосується контингенту осіб, що працюють на атомних електростанціях, медичних працівників (рентгенологів, радіологів), професійно пов'язаних із джерелами іонізуючого випромінювання. До цього часу не визначено особливості впливу комутагенів на формування променевого ефектів у соматичних клітинах людини, а також у здорових клітинах хворих, що оточують опромінювану пухлину.

У якості радіобіологічної основи для виконання цих досліджень пропонується тест-система культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) людини з метафазним методом аналізу аберацій хромосом, що дозволяє моделювати явище комутагенезу за різних експериментальних умов, у тому числі залежно від ступеня радіочутливості [11]. Вибір цієї моделі аргументовано високою чутливістю лімфоцитів до дії мутагенів, наявністю специфічних до дії іонізуючої радіації (ІР) хромосомних перебудов [12], які визнано біологічними маркерами підвищеного канцерогенного ризику [13, 14].

Актуальним є питання визначення особливостей впливу комутагенів на геном немалігнізованих клітин пацієнтів зі злякисними новоутвореннями. Це обґрунтовано більш високою чутливістю цих клітин до дії мутагенних факторів, оскільки прогресування пухлинного процесу пов'язане з появою нових мутаційних подій, відображенням яких є збільшення генетичних порушень внаслідок пригнічення процесів репарації за рахунок імунодепресії організму онкологічних хворих [1]. Відкритими питаннями, відповідь на які допоможе попередити розвиток стохастичних ефектів опромінення та променевого ускладненя у здорових клітинах, що оточують опромінювану пухлину, залишаються залежність прояву комутагенних ефектів від радіочутливості клітин, ступеня променевого навантаження, концентрації комутагенів.

**Мета роботи:** визначення особливостей формування радіаційно-індукованих аберацій хромосом

у ЛПК людини за умов комутагенної модифікації (дослідження *in vitro*).

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для виконання цитогенетичних досліджень були Т-лімфоцити периферичної крові 24 первинних онкогінекологічних хворих (рак тіла матки, рак шийки матки), віком 32–50 років (група дослідження) та 67 умовно здорових осіб віком 25–40 років (група порівняння). У роботі керувалися положенням Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації (2008 р.), яка передбачає інформовану згоду пацієнтів на участь у проведенні відповідних досліджень.

**Цитогенетичні методи:** виділення з периферичної крові Т-лімфоцитів та подальше культивування ЛПК проводили за стандартним протоколом [15] напівмікрометодом з деякими модифікаціями впродовж 52 та 72 год (з урахуванням радіочутливості клітин здорових осіб та онкологічних хворих). Метафазний аналіз аберацій хромосом виконували з груповим каріотипуванням і враховували частоту абераційних клітин, загальну частоту аберацій хромосом, частоту аберацій хроматидного та хромосомного типів. Аналізували в середньому 200–300 метафаз на одне цитогенетичне спостереження. У якості додаткового показника дослідили проліферативну активність ЛПК — мітотичний індекс.

**Опромінення культури клітин** здійснювали на рентгенівській установці «РУМ-17» (МОСРЕНТ-ГЕН, СРСР) у Національному інституті раку МОЗ України за наступних умов: сила струму — 10 мА, напруга — 180 кВ, фільтр 0,5 Сu, потужність дози — 0,89 Гр/хв, діапазон доз — 0,3; 0,5; 1,0 та 2,0 Гр на 0 год інкубації ЛПК ( $G_0$ -стадії клітинного циклу).

**Умови введення комутагенів.** У якості потенційних комутагенів обрано препарати профілактично-лікувального призначення: блокатор кальцієвих каналів Вп та антиоксидант АК. Комутагени вводили в культуру лімфоцитів безпосередньо після опромінення у терапевтичних концентраціях: Вп — 1,0 мкг/мл крові, АК — 20,0 мкг/мл крові; Вп вводили також у концентраціях, що перевищували значення терапевтичної дози в 1,5; 2,0 та 4,0 рази, а АК — в 2,0 та 4,0 рази відповідно.

**Молекулярні методи.** Дослідження мікросателітної нестабільності ДНК ЛПК виконували методом Inter-Simple Sequence Repeats полімеразно-ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР). ДНК виділяли з цільної гепаринізованої крові. Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,7% агарозному гелі. Розмір ампліконів визначали за допомогою маркерів молекулярної маси Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus з діапазоном 100–3000 п.н. (МВІ Fermentas, Литва).

**Імуноцитохімічні методи.** Для дослідження процесів апоптозу в ЛПК хворих онкологічного профілю 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).

**Статистичні методи.** Під час порівняння середніх значень цитогенетичних показників використовували *t*-критерій Стьюдента. Статистично значущими вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ( $p < 0,05$ ). Математичну обробку даних проведено за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel 2010, SPSS 17.

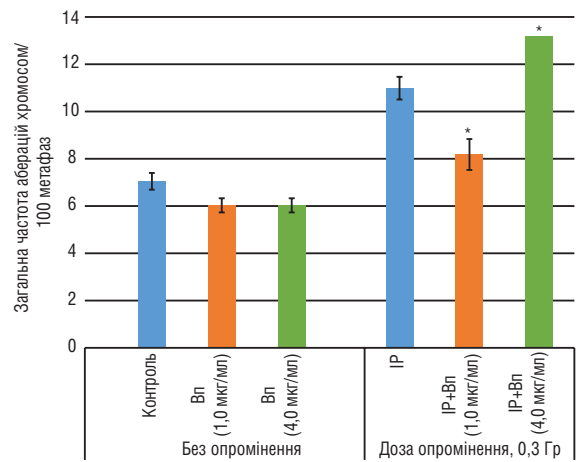
Для орієнтовної оцінки комутагенних ефектів залежно від доз діючих чинників обраховували коефіцієнт комутагенної модифікації (ККМ), який визначали за формулою:  $KKM = (M_1 - M_2) / M_2 \cdot 100$  [6], де  $M_1$  — загальна частота радіаційноіндукованих аберацій хромосом в ЛПК за умови додаткового впливу комутагену (Вп або АК);  $M_2$  — загальна частота радіаційно індукованих аберацій хромосом.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний аналіз ЛПК первинних онкологічних хворих, проведений до початку протипухлинної терапії, продемонстрував підвищення вихідного рівня хромосомних мутацій порівняно з показниками контрольної групи (~ в 3 рази), що свідчить про формування хромосомної нестабільності в клітинах внаслідок злякисного пухлинного процесу як джерела окисного стресу та імунодепресивного стану організму [16]. Препарат Вп у концентраціях 1,0 та 4,0 мкг/мл крові істотно не впливав на величину і спектр вихідного рівня аберацій хромосом у ЛПК хворих онкологічного профілю і становив  $6,0 \pm 0,7$  та  $6,0 \pm 1,0/100$  метафаз відповідно.

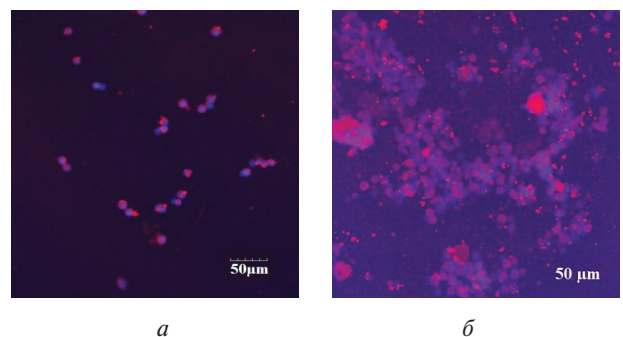
Результати модифікуючої дії Вп (1,0 і 4,0 мкг/мл) на опромінені (0,3 Гр) ЛПК онкологічних хворих були неоднозначними та залежали від концентрації препарату. Встановлено, що під впливом Вп у концентрації 1,0 мкг/мл рівень радіаційно індукованих пошкоджень хромосом знижувався в 1,3 раза (рис. 1). Але підвищення концентрації Вп до 4,0 мкг/мл, навпаки, зумовило зростання загальної частоти хромосомних перебудов порівняно з променевим ефектом (ККМ становив 20,0%). Таким чином, з підвищенням концентрації препарат Вп здатний проявляти комутагенну активність в опроміненіх немалігнізованих клітинах хворих онкологічного профілю.

Шляхом імуноцитохімічного аналізу встановлено, що під час опромінення низькою дозою та додаткової дії Вп у концентраціях 1,0 та 4,0 мкг/мл на ЛПК онкологічних хворих найбільша кількість каспаз-3-позитивних ядер цих клітин спостерігається за дії комутагену в концентрації 1,0 мкг/мл. Припускаємо, що внаслідок комбінованої дії ІР (0,3 Гр) та Вп (1,0 мкг/мл) частина ЛПК, ядра яких найбільш навантажені структурними пошкодженнями, елімінуються шляхом апоптозу і, як результат, зменшується кількість клітин з абераціями хро-



**Рис. 1.** Комбінований вплив ІР (0,3 Гр) і Вп (1,0; 4,0 мкг/мл) на частоту індукованих аберацій хромосом в ЛПК онкологічних хворих

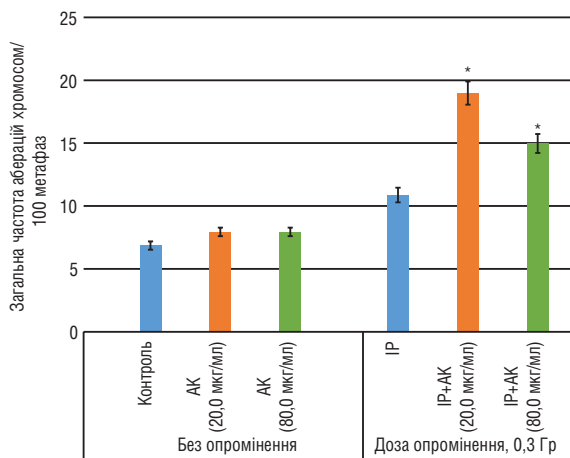
\* $p < 0,05$  порівняно з променевим ефектом



**Рис. 2.** Імуноцитохімічне комбіноване забарвлення ядерним барвником Hoechst та антитілами до маркера caspase-3 ЛПК онкологічних хворих: а — опромінені (0,3 Гр) ЛПК онкологічних хворих; б — комбінована дія ІР (0,3 Гр) та Вп (1,0 мкг/мл крові)

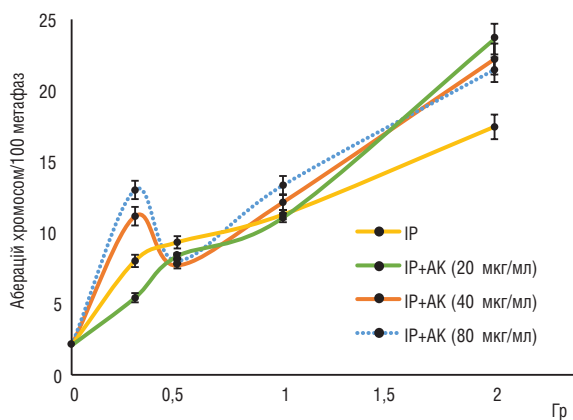
сом порівняно з ефектом опромінення. Зниження рівня радіаційно індукованих хромосомних перебудов, яке спостерігається під дією Вп в концентрації 1,0 мкг/мл, може бути пов'язане з активацією каспази-3, яка, у свою чергу, запускає каскад реакцій, результатом яких є загибель клітин [17]. Оскільки апоптоз ініціюється за рахунок підвищеного рівня іонів кальцію в клітинах, Вп (4,0 мкг/мл) інгібує його надходження в клітини, внаслідок чого кількість каспаз-позитивних ядер в опроміненіх ЛПК зменшується, що зумовлює формування комутагенного ефекту цього препарату (рис. 2).

Встановлено, що АК також, як і Вп, не впливає на вихідний рівень аберацій хромосом у неопроміненіх ЛПК онкологічних хворих (рис. 3). Характер комбінованої дії ІР в низьких дозах (0,3 Гр) і АК (20,0 та 80,0 мкг/мл) на ЛПК онкологічних хворих та здорових осіб в аналогічних модельних дослідженнях був різним. При опроміненні *in vitro* лімфоцитів крові хворих у низькій 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 ( $19,0 \pm 0,5$  ( $p < 0,05$ ) та  $15,0 \pm 0,7$  ( $p < 0,05$ ) про-

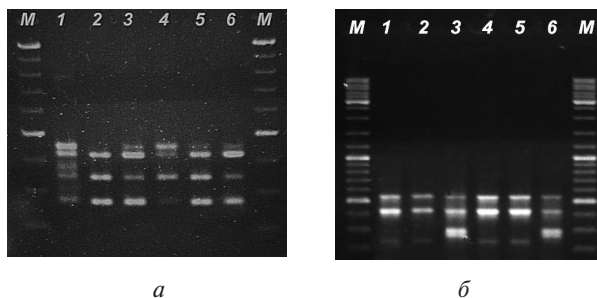


**Рис. 3.** Комбінований вплив IP (0,3 Гр) і АК (20,0; 80,0 мкг/мл) на частоту індукованих аберацій хромосом в ЛПК онкологічних хворих

\* $p < 0,05$  порівняно з променевим ефектом



**Рис. 4.** Комбінований вплив IP (0,3; 0,5; 1,0; 2,0 Гр) та АК (20,0; 40,0; 80,0 мкг/мл) на частоту аберацій хромосом у  $G_0$ -період клітинного циклу ЛПК здорових осіб



**Рис. 5.** Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймером  $(AG)_8T$  (а)  $(AG)_8CT$  (б). Позначення: М — маркер молекулярної маси 500–1000 п.н; 1 — інтактний контроль, кров онкологічних хворих; 2 — АК (20,0 мкг/мл); 3 — АК (80,0 мкг/мл); 4 — опромінення (0,3 Гр); 5 — опромінення (0,3 Гр) + АК (20,0 мкг/мл); 6 — опромінення (0,3 Гр) + АК (80,0 мкг/мл)

ти  $11,0 \pm 0,4$ ) (див. рис. 3). В опроміненіх (0,3 Гр) ЛПК відносно здорових осіб АК в концентрації 20 мкг/мл проявляла радіпротекторну дію, в концентрації 40 і 80 мкг/мл — комутагенний ефект (рис. 4). Комутагенний ефект АК формується в основному за рахунок аберацій хромосомного

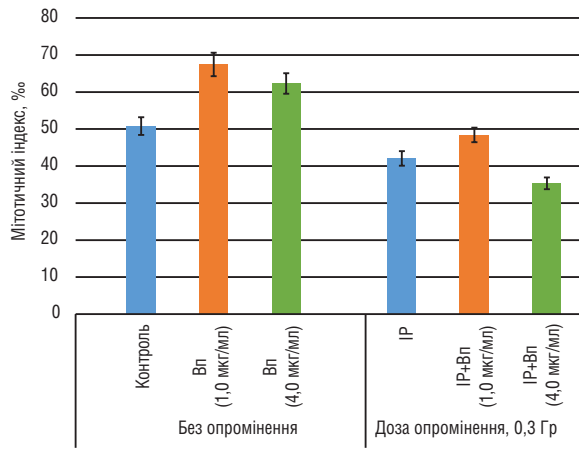
типу. Варто звернути увагу на те, що в опроміненіх клітинах онкологічних хворих найбільше підвищення частоти аберацій хромосом спостерігалось за додаткової дії АК в терапевтичній концентрації. Тобто замість очікуваного радіпротекторного ефекту ми спостерігаємо комутагенний ефект з коефіцієнтом модифікації 72,7%, який пов'язуємо з підвищеною радіочутливістю клітин хворих онкологічного профілю.

Беручи до уваги тісний зв'язок між розвитком злоякісного процесу та мікросателітною нестабільністю (МСН) ДНК [18], дослідили вплив комутагену АК (20,0 та 80,0 мкг/мл) на формування МСН ДНК в опроміненіх немалігнізованих клітинах онкологічних хворих. ISSR-ПЛР аналіз зразків крові первинних онкологічних хворих показав, що 4 праймери із 6 досліджених виявилися мономорфними  $(GA)_9C$ ;  $(AC)_8G$ ;  $(AC)_8C$ ;  $(GACA)_4$  до комбінованої дії малих доз IP (0,3 Гр) та АК (20,0; 80,0 мкг/мл). Відмінності між досліджуваними зразками крові хворих проявляються при використанні двох інших праймерів, що містили повтор  $(AG)_8$  (рис. 5а та 5б).

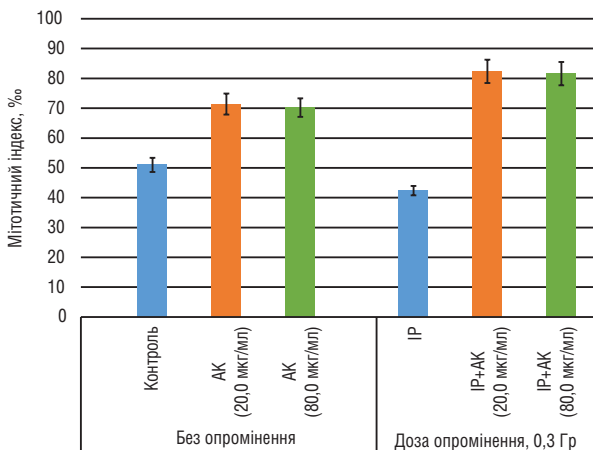
Встановлено, що у підтримці стабільності геному важливу роль відіграє система репарації неканонічних пар нуклеотидів у ДНК («mismatch repair») [14]. Відмінності в патернах фрагментів ампліфікації з праймерами  $(AG)_8T$  та  $(AG)_8CT$  в порівнянні з контрольними показниками вказують на вплив комутагену АК на реорганізацію нуклеотидної послідовності ДНК. На відміну від цього ISSR-ПЛР аналіз зразків крові в контрольній групі (здорових донорів) показав, що всі зразки, окрім контрольного, виявилися мономорфними за дослідженими праймерами. Таким чином, уперше виявлена МСН ДНК внаслідок комутагенної дії АК на опромінені в низькій дозі ЛПК онкологічних хворих, що може свідчити про порушення системи репарації помилково спарених нуклеотидів.

Показано, що Вп (1,0 та 4,0 мкг/мл) підвищує мітотичний індекс ЛПК онкологічних хворих в 1,2 та 1,3 раза відповідно. Однак при опроміненні в низьких дозах (0,3 Гр) за рахунок додаткового впливу Вп у високій концентрації (4,0 мкг/мл) мітотичний індекс ЛПК пригнічується в 1,2 раза порівняно з променевим ефектом та в 1,4 раза — з інтактним контролем (рис. 6а). АК незалежно від концентрації підвищує мітотичний індекс як в інтактних, так і в опроміненіх ЛПК онкологічних хворих, в 2,0 раза порівняно з променевим ефектом та в 1,6 раза — із контролем (рис. 6б).

Одержані результати дають підстави вважати, що комутагенні ефекти Вп та АК в опроміненіх ЛПК здорових осіб та онкологічних хворих формуються також за рахунок посиленої проліферації клітин, внаслідок чого скорочується час для репарації променевих пошкоджень. Такий механізм спричиняє реалізацію первинних радіаційно-індукованих пошкоджень у хромосомні аберації.



а



б

Рис. 6. Комбінована дія IP (0,3Гр), комутагенів Вп (1,0; 4,0 мкг/мл) (а) та АК (20,0; 80,0 мкг/мл) (б) на мітотичну активність ЛПК онкологічних хворих

Таким чином, формування комутагенних ефектів в опромінені клітинах людини залежить як від величини дози IP, ступеня радіочутливості клітин, так і від концентрації препаратів з комутагенною активністю та специфіки їх дії. В основі явища комутагенезу, що розвивається в опромінені здорових клітинах онкологічних хворих, у тому числі лімфоцитах циркулюючого пулу крові, лежать процеси формування хромосомної та мікросателітної нестабільності, апоптоз, стимуляція проліферації клітин.

## ВИСНОВКИ

1. При опроміненні (0,3 Гр) лімфоцитів крові онкологічних хворих в АК проявляє комутагенні властивості, підвищуючи частоту аберацій хромосом, в терапевтичній концентрації (20 мкг/мл), а Вп — у підвищеній концентрації (4,0 мкг/мл крові).

2. З підвищенням концентрації АК (20,0; 40,0; 80,0 мкг/мл) та Вп (1,0; 1,5; 2,0 та 4,0 мкг/мл) здійснюють стимулювальний вплив на мітотичну активність опромінені ЛПК онкологічних хворих.

3. На підставі проведеного ISSR-ПЛР-аналізу вперше встановлено, що в механізмах формування комутагенних ефектів АК в опромінені ЛПК хво-

рих певну роль відіграють порушення системи репарації помилково спарених нуклеотидів, що зумовлюють зміни в структурній організації ДНК (мікросателітна нестабільність).

4. В основі явища комутагенезу, що розвивається в опромінені ЛПК онкологічних хворих, лежать процеси формування хромосомної та мікросателітної нестабільності, апоптоз, стимуляція проліферації клітин.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

З метою запобігання віддаленим променевим ускладненням терапевтичного опромінення онкологічних хворих, у тому числі виникненню вторинних пухлин радіаційного генезу, рекомендується впровадження розробленого авторами статті Способу оцінки канцерогенної небезпеки за умов поєднаної дії малих доз іонізуючої радіації та препаратів з комутагенними властивостями у практику онкологічних закладів (інформаційний лист МОЗ України № 202-2015, Київ, МОЗ України; Укрмедпатент-інформ, 2015).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Domina EA. Radiogenic cancer: Epidemiology and primary prevention. Kyiv: Naukova dumka, 2016. 196 p (in Russian).
2. Domina EA, Pylypchuk OP, Mikhailenko VM. Destabilization of human cell genome under the combined effect of radiation and ascorbic acid. *Exp Oncol* 2014; **36** (4): 236–40.
3. Domina EA, Pylypchuk OP, Mikhailenko VM. The modifying effect of co-mutagens on the frequency and spectrum of radiation-induced chromosome aberrations in human cells. *Pharm Anal Acta* 2015; **6**: 377.
4. Morgan WF, Sowa MB. Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer Lett* 2015; **356** (1):17–21.
5. Durnev AD, Seredenin SB. Co-mutagenesis as new vistas in genotoxicology. *Bull Exp Biol Med* 2003; **135** (6): 513–20.
6. Durnev AD, Daugel-Dauge NO, Zhanataev AK, et al. Co-mutagenic effects of valocordin. *Ecol Genet* 2012; **10** (3): 53–8 (in Russian).
7. Ashraf AA, Shakoori AR. Cytotoxic and genotoxic effects of arsenic on primary human breast cancer cell lines. *Pakistan J Zool* 2015; **47** (1): 79–87.
8. Grujicic D, Milosevic-Djordjevic O, Arsenijevic S, Marinković D. Treatment of pregnant women with a beta mimetic and verapamil increases the micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. *Tohoku J Exp Med* 2008; **215** (4): 363–71.
9. Ashmawy IM, Nahas AF., Bayad AE. Teratogenic and cytogenetic effects of ivermectin and its interaction with P-glycoprotein inhibitor. *Res Vet Sci* 2011; **90** (1): 116–23.
10. Konopacka M, Rogolinski J. Clastogenic effects in human lymphocytes exposed to low and high dose rate X-ray irradiation and vitamin C. *Nukleonika* 2011; **56** (4): 253–7.
11. Demina EA, Pilinskaya MA, Petunin YuI, et al. Radiation cytogenetics: Russian-English dictionary-reference book. Kyiv: Zdorov'ya, 2009. 386 p (in Russian).
12. Sevankaev AV, Parshin VS, Mikhailova GF, et al. Comparative analysis of cytogenetic parameters with the morpho-functional state of the thyroid gland in children and adolescents living since the accident at the Chernobyl nuclear power plant in the territories of the Oryol and Kaluga regions contaminated with radionuclides. *Radiat Risk* 2006; **15** (1–2): 134–45 (in Russian).
13. Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk:

results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* 2004; **64** (6): 2258–63.

14. **Joyner MS, Kogel O.** Fundamentals of clinical radiobiology. Moscow: Binom. 2013. 600 p (in Russian).

15. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA, 2011. 232 p.

16. **Thompson SL, Compton DA.** Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res* 2011; (19): 433–44.

17. **Mazurkevich TA, Akseninko AV.** Apoptosis and its mechanisms (review). Scientific works of the Southern branch of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine 2013; (155): 309–16 (in Ukrainian).

18. **Sinicrope FA, Sargent DJ.** Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; **18** (6): 1506–12.

### THE SPECIFICITIES OF THE COMUTAGENESIS PHENOMENON FORMATION IN THE IRRADIATED CELLS OF CANCER PATIENTS

*E.A. Domina<sup>1</sup>, A.P. Pylypchuk<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

<sup>2</sup>*Medical diagnostic center «Diagnostics», Kyiv, Ukraine*

**Summary. Aim:** to determine the specificities of formation of radiation-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes under conditions of comutagenesis (in vitro studies). **Object and methods:** the cytogenetic study was carried out on peripheral blood T-lymphocytes of 24 primary gynecologic cancer patients (study group) and 67 conditionally healthy subjects (comparison group). Isolation and cultivation of peripheral blood lymphocytes and metaphase analysis of radiation-induced chromosome aberrations was performed according to the standard protocol. Comutagens were introduced into the cell culture immediately after X-irradiation in therapeutic concentrations: verapamil — 1.0 µg/ml blood, ascorbic acid — 20.0 µg/ml blood, as well as in concentrations exceeding their values. Polymerase chain reaction (PCR) method was used to study microsatellite DNA instability of blood lymphocytes; Immunocytochemical method was used to study the process of apoptosis. Statistical methods were used. **Results:** ascorbic acid and verapamil in the therapeutic concentration did not affect the initial level of aberrations of chromosomes in non-irradiated lymphocytes of oncological patients. With the increase of verapamil concentration up

to 4.0 µg/ml the frequency of chromosomal rearrangements in blood lymphocytes of cancer patients increased by 20.0%. By means of immunocytochemical analysis, we established that under irradiation with low doses (0.3 Gy) and additional action of verapamil (1.0 and 4.0 µg/ml blood) on lymphocytes of patients the highest number of caspase-3-positive nuclei in these cells is observed under the action of comutagen at 1.0 µg/ml. Under irradiation of lymphocyte culture at low doses (0.3 Gy) and under the additional action of ascorbic acid (20.0 and 80.0 µg/ml) the comutagenic effect — increase of aberration frequency by 1.7–1.4 times in comparison with radiation effect ( $19.0 \pm 0.5$  and  $15.0 \pm 0.7$  vs  $11.0 \pm 0.4$ ) was found. For the first time was detected DNA microsatellite instability due to comutagenic action of ascorbic acid on blood lymphocytes of irradiated in low dose patients. This fact could indicate the disturbance of misfolded nucleotides repair system in cells of circulating blood pools of patients. **Conclusions:** in irradiation (0.3 Gy) of blood lymphocytes of oncological patients, ascorbic acid exhibits comutagenic properties in a therapeutic concentration (20 µg/ml), and verapamil — at an increased concentration (4.0 µg/ml of blood). The increase in ascorbic acid (20.0; 40.0; 80.0 µg/ml) and verapamil (1.0; 1.5; 2.0 and 4.0 µg/ml) had stimulating effect on mitotic activity of irradiated lymphocytes of cancer patients. It was established for the first time that in the mechanisms of formation of comutagenic effects of ascorbic acid in the irradiated blood lymphocytes an important role is played by the disturbances of the system of reparation of wrongly paired nucleotides, causing changes in the DNA structural organization (microsatellite instability). The phenomenon of comutagenesis that develops in the irradiated lymphocytes of cancer patients is based on the processes of chromosomal and microsatellite instability, apoptosis and stimulation of cell proliferation.

**Key Words:** comutagens, irradiated lymphocytes, cancer patients, chromosome aberrations, microsatellite instability.

#### Адреса для листування:

Дьоміна Е.А.

Київ, 03022, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: edjomina@ukr.net

Одержано: 30.05.2021