

УДК 615:849

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.37451

ВПЛИВ ОКСИДУ АЗОТУ НА ФОРМУВАННЯ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ЛЮДИНИ В УМОВАХ КО-МУТАГЕННОЇ МОДИФІКАЦІЇ

© Е. А. Дьоміна, В. М. Михайленко, О. П. Пилипчук

Встановлено, що за дії оксиду азоту на лімфоцити людини додатковий вплив ко-мутагену аскорбінової кислоти у високій концентрації підвищує рівень хроматидних аберацій та пригнічує проліферативний потенціал клітин. Беручи до уваги екологічну ситуацію, що склалася в Україні, в тому числі за рахунок головного забруднювача повітря оксиду азоту, одержані результати мають значення при проведенні екологічного моніторингу довкілля

Ключові слова: оксид азоту, ко-мутаген, аскорбінова кислота, лімфоцити крові, аберації хромосом, проліферативний потенціал

Aim. Identify the features of formation of chromosomal instability in lymphocytes of nominally healthy individuals under conditions of combined action of nitrogen oxides (NO) and ascorbic acid (AA), depending on their concentration (study in vitro).

Material and methods. Culture of human peripheral blood lymphocytes (PBL) with metaphase analysis of chromosome aberrations. Nitrosated glutathione as the main transport form of NO injected into PBL culture in the concentration range 0,25–0,5–1,0 mmol/ml of blood. As co-mutagen used AA in the concentration range 20,0–40,0–80,0 mg/ml of blood, corresponding therapeutic drug concentrations, as well as 2 and 4 times exceeding its value.

Results. Discovered co-mutagenic effect of AA manifested in increasing the overall frequency of chromosomal aberrations in 1.7 and 1.4 times respectively the concentration of NO. The spectrum induced damage presents a whole by chromatid type aberrations that occur mainly by single-strand DNA breaks and kept stable in a number of cell generations. In all experimental observation points an additional impact of AA (regardless of concentration) strengthened depressing effect of NO in concentration of 1.0 mmol/ml of blood on proliferative potential of cells.

Conclusions. By the action of chemical mutagens NO on blood lymphocytes of nominally healthy persons an additional impact of AA in high concentration (80 mg/ml of blood) complicates chromosome instability of cells, increasing the level chromatid aberrations in 2 times, and inhibits their proliferative potential

Keywords: nitrogen oxide, co-mutagen, ascorbic acid, blood lymphocytes, chromosome aberration, proliferative potential

1. Вступ

Експериментальні та епідеміологічні спостереження переконують в тому, що заново індуковані мутації за рахунок факторів навколишнього середовища обумовлюють підвищення рівня захворювань, в тому числі онкологічних. Чинне місце у вирішенні/подоланні цієї проблеми має займати вивчення особливостей та механізмів дії ко-мутагенів, що не проявляють власної мутагенної активності, але можуть суттєво модифікувати (потенціювати) генотоксичні ефекти деяких чинників хімічної природи. Особливу небезпеку серед виявлених ко-мутагенів являють препарати медичного призначення.

2. Огляд літератури

Важливу роль у дестабілізації геному людини відіграє вплив одного з найпотужніших та найбільш поширених хімічних мутагенних чинників довкілля – оксидів азоту (ОА). Встановлено мультипотентний характер дії ОА на соматичні клітини людини, в тому числі за рахунок накопичення хромосомних перебудов, які можуть слугувати коректним біологічним маркером підвищеного канцерогенного ризику [1–3]. При цьому домінуючим механізмом у формуванні хромосомних аберацій за дії ОА розглядають їх здатність до пригнічення ферментів репарації [4]. Фактичного матеріалу, що з'ясував би механізми ко-мутагенезу, недостатньо. В цьому напрямку виконано поодинокі та

фрагментарні дослідження на культурі клітин експериментальних тварин. Виникає питання щодо універсальності формування ко-мутагенних ефектів в соматичних клітинах людини. На думку дослідників [5], об'єктивна відповідь може бути отримана внаслідок проведення цитогенетичних досліджень на культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Нещодавно нами встановлено ко-мутагенні властивості кардіологічного препарату верапамілу, якій може потенціювати радіаційно-індуковані цитогенетичні ефекти в соматичних клітинах умовно здорових осіб [6]. Дотепер не ставалося і тому не вирішувалося питання щодо впливу ко-мутагенів на формування генотоксичних ефектів ОА, які визнані головним забруднювачем атмосферного повітря і можуть суттєво підвищувати обсяг генетичного тягаря в популяціях людини [7]. Окремий науково-практичний інтерес представляє визначення ко-мутагенних властивостей у найбільш поширеного в медичній практиці серед препаратів антиоксидантів аскорбінової кислоти (АК), для якої на даний час існує певна невизначеність в оцінці характеру її впливу на геном людини.

3. Мета роботи

Визначити особливості формування хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові умовно здорових осіб за умов комбінованої дії ОА та АК в залежності від їх концентрації (дослідження *in vitro*).

4. Матеріали і методи

Цитогенетичне дослідження виконано в умовах *in vitro* з використанням тест-системи лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) умовно здорових осіб, віком 23–34 р., які дали інформовану згоду на участь у дослідженнях. У роботі керувались положенням Хельсінкської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2008 р.), а також загальними етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.). Алгоритм дослідження наведено на рис. 1.



Рис. 1. Алгоритм цитогенетичного дослідження (*in vitro*): ФГА – мітоген, ОА – оксид азоту, АК – аскорбінова кислота, К – колцемід, Ф- фіксація культури клітин

Вибір даної моделі аргументовано високою чутливістю даних клітин до дії мутагенних чинників, в тому числі оксидів азоту [3, 7], що дозволяє моделювати особливості формування хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за різних експериментальних умов. Нітрозований глутатіон, як основну транспортну форму ОА, вводили в культуру

ЛПК в G₀-періоді клітинного циклу в діапазоні концентрацій 0,25–0,5–1,0 мкМ/крові. В якості ко-мутагену використовували АК в інтервалі концентрацій 20,0–40,0–80,0 мкг/мл крові, що відповідало терапевтичній концентрації препарату, а також у 2 і 4 рази перевищуючи її значення. Культивування ЛПК, приготування препаратів хромосом і цитогенетичний (метафазний) аналіз клітин виконували відповідно до стандартного протоколу [8]. З метою оцінки проліферативного потенціалу лімфоцитів за різних експериментальних умов визначали мітотичний індекс (кількість мітозів / 2000 проаналізованих клітин). Математичну обробку одержаних експериментальних даних проводили стандартними методами з використанням програми Excel [9].

5. Результати та обговорення

На рис. 2 проілюстровано, що під впливом ОА частота аберацій хромосом підвищується в середньому у 2 рази порівняно зі спонтанним рівнем. АК в діапазоні концентрацій 20,0–40,0 мкг/мл крові не впливає на рівень хромосомних пошкоджень, індукованих ОА в лімфоцитах крові донорів. Але додатковий вплив АК на ЛПК донорів в концентрації 80,0 мкг/мл, що перевищує терапевтичну дозу препарату у 4 рази, потенціює дію ОА в концентраціях 0,5 мкМ/мл та 1,0 мкМ/мл (рис. 2). Виявлений ко-мутагенний ефект АК проявляється у підвищенні загальної частоти аберацій хромосом в 1,7 і 1,4 рази відповідно до концентрації ОА.



Рис. 2. Загальна частота аберацій хромосом в лімфоцитах людини за умов комбінованої дії ОА (0,5–1,0 мкМ/мл крові) та АК (20–80 мкг/мл).

Позначення: —▲— ОА(0,5 мкМ/мл крові);
--◻-- ОА(1,0 мкМ/мл крові)

Зауважимо, що за дії ОА спектр індукованих пошкоджень представлено в цілому абераціями хроматидного типу (делеції і обміни), які виникають переважно за рахунок одностркових розривів ДНК і стабільніше зберігаються у ряду клітинних генерацій. Індуковані аберації даного типу відіграють визначальну роль у розвитку хромосомної нестабільності за дії мутагенів хімічної природи (в нашому дослідженні ОА), яка є проявом нестабільності геному клітин. Найвищу ко-мутагенну активність за рівнем хроматидних аберацій АК

проявляє в концентрації 80,0 мкг/мл, потенціуючи дію ОА (0,5 мкМ/мл) у 2 рази (рис. 3).

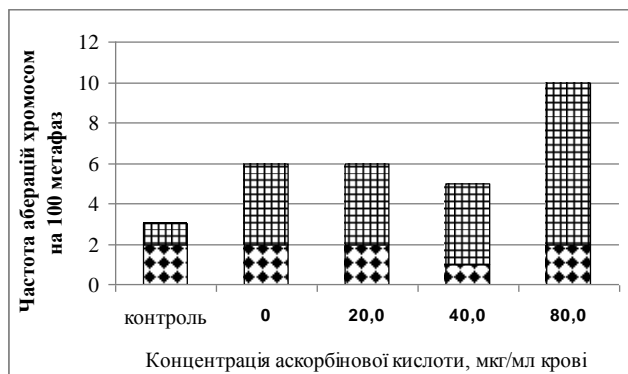


Рис. 3 Частота і спектр аберацій хромосом за умов комбінованої дії ОА (0,5 мкМ/мл) та АК (20,0-80,0 мкг/мл) на ЛПК донорів – аберації хромосомного типу; – аберації хроматидного типу

Таким чином, АК у високій концентрації потенціює дію ОА на хромосомному рівні соматичних клітин людини в 2 рази (рис. 3). Залишається нез'ясованим питання стосовно впливу ко-мутагенів на проліферативний потенціал соматичних клітин людини. Це пов'язано з тим, що чутливість клітин та організму людини до дії мутагенів визначається в цілому репаративним потенціалом, що тісно пов'язаний з імунною системою [10]. Тому науково-практичне значення має дослідження мітотичної активності насамперед імуннокомпетентних клітин – Т-лімфоцитів, які визнані об'єктивними індикаторами дії мутагенних чинників [11].

В нашому дослідженні показано, що ОА в концентрації 0,5 мкМ/мл крові пригнічує мітотичну активність лімфоцитів в культурі ~ на 20 % в порівнянні з контролем (рис. 4). Подальше підвищення концентрації ОА у 2 рази (від 0,5 мкМ до 1,0 мкМ/мл крові) вже не впливало на значення мітотичного індексу, що співпадає з даними, отриманими нами раніше [7]. В рамках нашого дослідження окрема дія АК в діапазоні концентрацій 20,0–80,0 мкг/мл крові суттєво не впливала на мітотичну активність клітин. Слід відзначити, що в усіх експериментальних точках спостережень додатковий вплив АК (незалежно від її концентрації) підсилював пригнічуючий вплив ОА в концентрації 1,0 мкМ/мл крові. Але найбільше пригнічення спостерігалось за умов комбінованого впливу ОА та АК (80,0 мкг/мл), а саме, на 24 % порівняно з ефектом окремої дії ОА та ~ на 39 % – з контролем (рис. 4). В рамках виконаного експериментального дослідження можна припустити, що пригнічуючий вплив ОА на мітотичну активність Т-лімфоцитів в більшій мірі залежить від концентрації ко-мутагену АК.

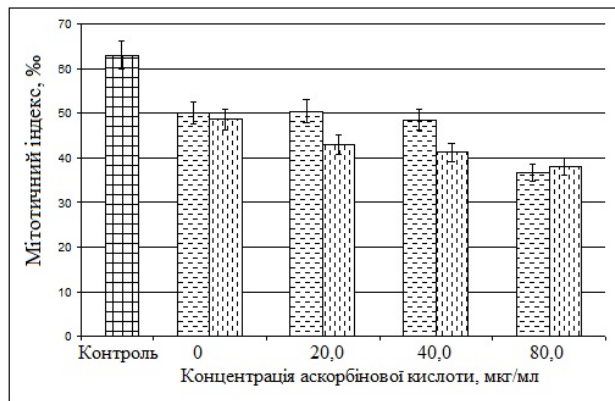


Рис.4. Дослідження впливу комбінованої ОА (0,5–1,0 мкМ/мл крові) і АК (20,0–80,0 мкг/мл крові) на мітотичну активність ЛПК здорових донорів. Позначення: – контроль; – ОА (0,5 мкМ/мл); – ОА (1,0 мкМ/мл)

Комбінований вплив різних агентів хімічної природи на геном людини є небезпечний з точки зору індукції мутагенних, ко-мутагенних та канцерогенних ефектів. Оскільки поява хромосомних змін в клітинних популяціях визнано потенційно онкогенною, то комбінований вплив ОА та речовин з ко-мутагенними властивостями на геном людини може підвищувати канцерогенний ризик. Беручи також до уваги екологічну ситуацію, що склалася в Україні, в тому числі, як підкреслено вище, за рахунок головного забруднювача атмосферного повітря ОА, одержані результати можуть мати значення при проведенні екологічного моніторингу довкілля.

6. Висновок

Вперше встановлено, що за дії хімічного мутагену ОА на лімфоцити крові умовно здорових осіб додатковий вплив АК у підвищеній концентрації (80 мкг/мл крові) ускладнює хромосомну нестабільність клітин, збільшуючи рівень хрома-тидних аберацій у 2 рази, та пригнічує їх проліферативний потенціал.

Література

1. Маеда, Х. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке [Текст] / Х. Маеда, Т. Акаике // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 1007–1019.
2. Винк, Д. А. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний [Текст] / Д. А. Винк, И. Г. Водовоз, Дж. А. Кук // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 948–957.
3. Дьоміна, Е. А. Деякі аспекти генетичної нестабільності соматичних клітин людини за комбінованої дії іонізуючої радіації та оксиду азоту [Текст] / Е. А. Дьоміна // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 3. – С. 39–45.
4. Дьоміна, Е. А. Особливості формування радіаційно-індукованих аберацій хромосом в клітинах людини за умов модифікуючого впливу хімічних агентів [Текст] / Е. А. Дьоміна, О. П. Пилипчук // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2013. – Т. 1, № 18. – С. 330–337.

5. Дурнев, А. Д. Ко-мутагенез – новое направление исследований в генотоксикологии [Текст] / А. Д. Дурнев, С. Б. Серединин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 35, № 6. – С. 604–612.

6. Дьоміна, Е. А. Радіаційно-індуковані аберації хромосом в лімфоцитах людини за дії ко-мутагенів (дослідження *in vitro*) [Текст] / Е. А. Дьоміна, О. П. Пилипчук // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 3. – С. 46–52.

7. Mikhailenko, V. M. Nitric oxide coordinates development of genomic instability in realization of combined effect with ionizing radiation [Text] / V. M. Mikhailenko, E. A. Diomina, I. I. Muzalov, B. I. Gerashchenko // Experimental Oncology. – 2013. – Vol. 35, Issue 1. – P. 58–64.

8. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies [Text] / Vienna: IAEA, 2011. – 232 p.

9. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 408 с.

10. Рак щитовидной железы [Текст] / под ред. Ю. А. Гриневича, А. А. Чумака. – К.: Здоров'я, 2011. – 208 с.

11. Дёмина, Э. А. Радиационная цитогенетика [Текст] / Э. А. Дёмина, М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин. – К.: Здоров'я, 2009. – 367 с.

References

1. Maeda, H., Akaike, T. (1998). Oksid azota i kislorodnyie radikalyi pri infektsii, vospalenii i rake [Nitric oxide and oxygen radicals at an infection, inflammation and cancer]. *Biochemistry*, 63 (7), 1007–1019.

2. Vink, D. A., Vodovoz, I. G., Kuk, D. A. (1998). Znachenie himicheskikh svoystv oksida azota dlya lecheniya onkologicheskikh zabolovaniy [Value of chemical properties of nitric oxide for treatment of oncologic diseases]. *Biochemistry*, 63 (7), 948–957.

3. Domina, E. A. (2013). Deyaki aspekti genetichnoyi nestabilnostI somatichnih klitin lyudini za kombinovanoyi diyi ionizuyuchoyi radlatsiyi ta oksidu azotu [Some aspects of genetic instability of somatic cells of man are at the combined

action of ionizing radiation and nitric oxide]. *Herald of Ukrainian Society of Geneticists and Selectionists*, 11 (3), 39–45.

4. Domina, E. A., Pylypchuk, E. P. (2013). Osoblivosti formuvannya radiatsiyino-indukovanih aberatsiy hromosom v klitinah lyudini za umov modifikuyuchogo vplyvu himichnih agentive [Features of forming of the radiation-induced aberrations of chromosomes are in the cells of man at the terms of modifying influence of chemical agents]. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*, 18 (1), 330–337.

5. Durnev, A. D., Seredynyn, S. B. (2003). Komutahenez – novoe napravlenie issledovaniy v henotoksikologii [Co-mutagenesis - a new direction of research in genotoksikologii]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 35 (6), 604–612.

6. Domina, E. A., Pylypchuk, E. P. (2013). Radiatsiyino-indukovani aberatsiyi khromosom v limfotsytakh lyudyny za diyi ko-mutaheniv (doslidzhennya *in vitro*) [Radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by action of co-mutagens (study *in vitro*)]. *Herald of Ukrainian Society of Geneticists and Selectionists*, 11 (3), 46–52.

7. Mikhailenko, V. M., Diomina, E. A., Muzalov, I. I., Gerashchenko, B. I. (2013). Nitric oxide coordinates development of genomic instability in realization of combined effect with ionizing radiation. *Experimental Oncology*, 35 (1), 58–64.

8. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies (2011). Vienna: IAEA, 232.

9. Lapach, S. N., Gubenko, A. V., Babich, P. N. (2000). Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh isle-dovaniyah s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in researches for medicine and biology with the use of Excel]. Kiev, Ukraine: Zdorov'ya, 408.

10. Grinevich, Yu. A., Chumak, A. A. (Eds.) (2011). Rak schitovidnoy zhelezyi [Cancer of thyroid]. Kiev, Ukraine: Zdorov'ya, 208.

11. Domina, E. A., Pilinskaya, M. A., Petunin, Yu. I., Klyushin, D. A. (2009). Radiatsionnaya tsitogenetika [Radiation cytogenetics]. Kiev, Ukraine: Zdorov'ya, 367.

Дата надходження рукопису 27.01.2015

Дьоміна Емілія Анатоліївна, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник, відділ екології і радіобіології, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького Національної Академії Наук України, вул. Васильківська, 45, м. Київ, Україна, 03022

E-mail: edjomina@ukr.net

Михайленко Віктор Михайлович, кандидат біологічних наук, завідувач відділу екології і радіобіології Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького Національної Академії Наук України, вул. Васильківська, 45, м. Київ, Україна, 03022

E-mail: mvmik@yahoo.com

Пилипчук Олена Петрівна, провідний інженер відділу екології і радіобіології, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького Національної Академії Наук України, вул. Васильківська, 45, м. Київ, Україна, 03022

E-mail: lena.pylypchuk@ukr.net