

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.11.084>

УДК 616-006.03:616-001.28

**Э.А. Дёмина¹, И.И. Смоланка²,
В.М. Михайленко¹**

¹ Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

² Национальный институт рака, Киев

E-mail: edjomina@ukr.net

Влияние меланин-глюканового комплекса на радиочувствительность клеток больных с предопухоловой патологией грудной железы

Представлено академиком НАН Украины В.Ф. Чехуном

Приведены результаты исследования влияния меланин-глюканового комплекса (МГК) на радиочувствительность лимфоцитов крови больных с предопухоловой патологией грудной железы в зависимости от концентрации препарата. Использована тест-система лимфоцитов периферической крови с метафазным анализом aberrаций хромосом (24 наблюдения). Показано, что МГК влияет на радиочувствительность клеток крови больных, снижая уровень индуцированных aberrаций хромосом, в том числе лучевых маркеров. Наиболее эффективно радиозащитное действие МГК проявляется при концентрации препарата 2,0 мкг/мл крови. С учетом его антиоксидантных свойств полученные данные аргументируют существенную роль оксидативного статуса клеток в формировании их хромосомной нестабильности.

Ключевые слова: радиочувствительность, меланин-глюкановый комплекс, предопухоловая патология, лимфоциты, aberrации хромосом, нестабильность генома.

Заболееваемость раком грудной железы (РГЖ) занимает ведущее место в мире среди женского населения, при этом смертность лиц трудоспособного возраста от РГЖ составляет 24,3 %. Одним из этиологических экзогенных факторов его развития являются ионизирующие излучения. Особенную остроту эта проблема приобрела в связи с Чернобыльской катастрофой и не утратила ее вследствие масштабности радиоактивного загрязнения территорий Украины [1]. Частота заболеваний РГЖ у женщин, проживающих на более загрязненных радионуклидами территориях, за 15 лет повысилась по сравнению с регистрируемой на менее загрязненных территориях. К первостепенным мероприятиям по снижению заболеваемости и смертности от РГЖ относят профилактику и раннюю диагностику предопухоловых заболеваний грудной железы (фиброаденоматоз и другие формы с высоким риском малигнизации). С учетом радиочувствительности тканей этого органа [1, 2] при-

© Э.А. Дёмина, И.И. Смоланка, В.М. Михайленко, 2018

ритетными являются клинико-экспериментальные исследования, направленные на разработку и использование препаратов, повышающих их резистентность к воздействию ионизирующей радиации.

Нестабильность генома и канцерогенез. Согласно современным представлениям, определяющую роль в инициации радиационного канцерогенеза играет нестабильность генома. Идентичность механизмов цитогенетических эффектов и онкогенной трансформации в области действия низких уровней ионизирующей радиации свидетельствует в пользу этого положения. “Рак — генетически детерминированное заболевание, возникающее вследствие нарушения нормальной регуляции роста клеток под влиянием разнообразных мутаций” [3]. При этом превращение доброкачественной опухоли в злокачественную сопряжено с повышенной генетической нестабильностью, что предполагает индукцию дополнительных мутаций (табл. 1) [4, 5]. Ионизирующие излучения относят к наиболее сильным иммунодепрессантам и полным канцерогенам, которые способны реализовывать свой неопластический потенциал на всех этапах опухолевого процесса. Участие ионизирующих излучений может выражаться также в осуществлении одного из этапов канцерогенеза. Злокачественная трансформация клеток обнаруживается уже при дозах менее 0,3 сГр, что незначительно превышает уровень радиационного фона [6]. Таким образом, ионизирующая радиация может инициировать и вызывать возникновение новых опухолей и/или ускорять процессы злокачественной трансформации клеток, развитие которых вначале не было связано с облучением [7]. Отсюда важным являются поиск и применение модификаторов, усиливающих радиорезистентность генома, в первую очередь клеток, высокочувствительных к действию ионизирующих излучений и других мутагенов. В соответствии с законом Бергонье и Трибондо, чем выше способность клеток к размножению, тем они более радиочувствительны. Исключение составляют лимфоциты периферической крови (ЛПК), которые, находясь в периферическом пуле крови в стадии покоя (G_0), проявляют чрезвычайно высокую радиочувствительность. Поэтому наилучшей радиобиологической основой для исследования модификаторов с целью повышения резистентности клеток человека к облучению является тест-система ЛПК с метафазным анализом аббераций хромосом [1].

Модифицирующее влияние меланин-глюканового комплекса на частоту и спектр радиационно-индуцированных аббераций хромосом в лимфоцитах крови больных с предопухоловой патологией грудной железы. В качестве модификатора радиочувствительности соматических клеток человека особого внимания заслуживает меланин-глюкановый комплекс (МГК), в состав которого входят меланиновые пигменты грибного происхождения, выступающие в роли радиопротектора, и глюканы, характеризующиеся большим количеством парамагнитных центров [8–10]. Такой состав МГК обуславливает его антиоксидантные свойства, нейтрализацию свободных радикалов, снижение уровня пероксидного окисления, предупреждение развития радиационно-индуцированных повреждений клеточных мембран, а также генопротекторное действие на уровне ДНК. Ранее группой украинских исследователей было показано, что сочетание мощных противолучевых свойств данного радиомодификатора способствует снижению интенсивности оксидативного стресса в условиях хронического облучения экспериментальных животных в малых дозах [11–14].

Нами впервые выполнено исследование влияния МГК на радиочувствительность немалигнизированных клеток больных с предопухоловой патологией грудной железы (ППГЖ).

Использована тест-система ЛПК с метафазным анализом aberrаций хромосом в облученных клетках (24 наблюдения). Культивирование ЛПК, приготовление цитогенетических препаратов, метафазный анализ равномерно окрашенных хромосом наиболее детально описан в работе [15]. В качестве митогена лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (форма М, “Gibco Invitrogen”, США). МГК в концентрации 2,0–10,0 мкг/мл крови вводили перед облучением, которое осуществляли на рентгеновской установке РУМ-17 в Национальном институте рака. Условия облучения культуры клеток: мощность дозы 0,89 Гр/мин, сила тока 10 мА, напряжение 180 кВ, фильтр 0,5 Cu + 1 Al в G₀-периоде клеточного цикла. Доза облучения составляла 2,0 Гр.

На первом этапе исследования влияния МГК на радиационно-индуцированные цитогенетические эффекты в лимфоцитах крови больных с ППГЖ изучен спонтанный (контрольный) уровень aberrаций хромосом, а также их спектр. Значения цитогенетических показателей (процент клеток с aberrациями хромосом, общая частота aberrаций хромосом/100 метафаз, частота aberrаций хроматидного и хромосомного типов, фрагментов и обменов) отражены в табл. 2.

Показано, что частота aberrантных клеток, общая частота aberrаций хромосом, в том числе хромосомных обменов, достоверно превышают значения среднепопуляционного показателя (1,5–1,7 %) и в 4 раза — верхнюю границу нормы данных показателей (3 %). При этом частота aberrаций на одну aberrантную клетку превышает 1. Наиболее распростра-

Таблица 1. Этапы канцерогенеза [5]

Этап	Описание этапа
Инициация	Метаболическая активация ксенобиотиков с образованием конечных высокоактивных канцерогенов, действующих как УФ- и ионизирующая радиация на ДНК клеток-мишеней (генотоксический и окислительный стрессы). Под влиянием активации онкогенов клетка приобретает необратимые изменения (1–3 специфические мутации). Инициированная (трансформированная) клетка неотличима морфологически от нормальной. Неуловимые фенотипические изменения проявляются лишь после образования клеточного клона: ускоренный рост, нарушения формы ядер, продукция АКТГ мелкоклеточным раком бронхов. Агенты-инициаторы действуют непосредственно на ДНК (канцерогены, ксенобиотики, радиация). Активные формы кислорода прямо атакуют азотистые основания и дезоксирибозу ДНК или опосредованно — через токсические альдегиды
Промоция	Процесс ускоренной пролиферации опухолевого клона, с образованием под влиянием окислительного стресса доброкачественной опухоли, на первом этапе обратимый, на <i>втором — необратимый (возникновение дополнительных мутаций)</i> . В эксперименте на мышах классическими промоторами являются форболовые эфиры компоненты кротонного масла для кожи, сахарин — для мочевого пузыря, фенобарбитал — для печени. В качестве промоторов могут выступать полиамины (спермидин) и другие стимуляторы пролиферации
Прогрессия	<i>Превращение доброкачественной опухоли в злокачественную сопряжено с увеличенной генетической нестабильностью</i> , значительным ускорением роста, инвазивностью (способностью прорастать через базальные мембраны в соседние здоровые ткани и в кровотоки), возникновением метастазов. Генетическая нестабильность ассоциирована с раковой прогрессией, мутациями онкогенов и тумор-супрессорных генов, например p53. Возникает сеть взаимодействующих онкогенов и супрессоров, определяющая множественность путей канцерогенеза

ненный тип аберраций представлен одиночными и парными фрагментами. Все аберрации хроматидного типа относятся к делециям и изodelециям, т. е. к акроцентрикам (7,5 аберраций/100 метафаз). Согласно современным представлениям, на базе аберраций такого типа происходит формирование несбалансированного набора хромосом, т. е. смещение генетического материала и изменение его количественного состава. Это может индуцировать формирование злокачественного клона клеток. Под влиянием МГК в концентрации 2 мкг/мл крови частота этих аберраций снижается до контрольных значений.

Относительно аберраций хромосомного типа, то их среднегрупповая частота составляет 4,5/100 метафаз. В спектре аберраций регистрируются обмены хромосомного типа, т. е. лучевые маркеры (2/100 метафаз), что значительно превышает величину среднепопуляционного показателя (1/1000 лимфоцитов). Под влиянием МГК независимо от его концентрации хромосомные обмены “исчезают” (см. табл. 2). Интересно отметить тот факт, что в контрольных культурах лимфоцитов единичных больных регистрируются мультиаберрантные клетки — до 6 аберраций хромосом в одной клетке.

Таким образом, предварительные данные цитогенетического обследования больных с ППГЖ указывают на нестабильность генома немалигнизированных клеток, проявлением которой является дестабилизация их хромосомного аппарата. При этом дополнительное воздействие мутагенных факторов на организм больных с указанной предопухоловой пато-

Влияние меланин-глюканового комплекса на частоту лучевых маркеров в лимфоцитах крови больных с ППГЖ: 1 — интактный контроль; 2 — облучение в дозе 2,0 Гр; 3 — МГК 2,0 мкг/мл крови + облучение в дозе 2,0 Гр; 4 — МГК 4,0 мкг/мл крови + облучение в дозе 2,0 Гр; 5 — МГК 10,0 мкг/мл крови + облучение в дозе 2,0 Гр

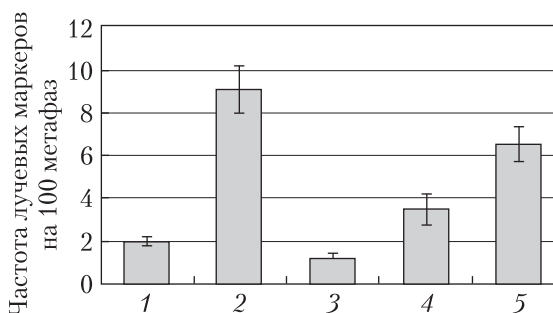


Таблица 2. Влияние меланин-глюканового комплекса на частоту и спектр аберраций хромосом при облучении *in vitro* лимфоцитов периферической крови больных с ППГЖ (среднегрупповые значения показателей; $p \leq 0,05$)

Вариант	Частота аберрантных клеток, %	Общая частота аберраций хромосом / 100 метафаз	Аберрации хроматидного типа	Аберрации хромосомного типа		
				Парные фрагменты	Обмены	Всего
Контроль	9,2 ± 1,06	12,08 ± 3,33	7,5	2,5	2	4,5
2 мкг/мл крови МГК	3,17 ± 1,17	3,17 ± 1,17	2,8	0,3	—	0,3
4 мкг/мл крови МГК	4,57 ± 0,22	4,47 ± 0,22	4,2	0,4	—	0,4
10 мкг/мл крови МГК	6,3 ± 3,7	6,3 ± 3,7	5,6	0,7	—	0,7
Облучение, 2 Гр	16,6 ± 3,7	20,77 ± 4,17	6,6	5	9	14
2 мкг/мл крови МГК + 2 Гр	5,55 ± 1,05	5,5 ± 1,05	2,5	1,8	1,25	3,05
4 мкг/мл крови МГК + 2 Гр	12,03 ± 2,58	14,5 ± 3,83	3,7	7,1	3,5	10,6
10 мкг/мл крови МГК + 2 Гр	11,97 ± 2,7	14,93 ± 4,19	2,6	5,5	6,5	12

логией будет усложнять генетическую нестабильность и в ряде случаев может служить промотором злокачественной трансформации клеток (см. табл. 1).

На втором этапе исследования изучено модифицирующее влияние МГК на радиационно-индуцированные эффекты в ЛПК больных с указанной предопухоловой патологией. Установлено, что при введении МГК в культуру ЛПК перед облучением в дозе 2,0 Гр в зависимости от концентрации модификатора (2; 4; 10 мкг/мл крови) частота aberrаций хромосомом снижается приблизительно в 3,8; 2,7 и 1,9 раза соответственно. Таким образом, наиболее эффективно радиозащитное действие МГК проявляется, как и в случае спонтанных aberrаций, при наименьшей исследованной концентрации (2 мкг/мл крови). Важно отметить, что это действие происходило за счет aberrаций обоих типов. Однако наибольший практический интерес вызывает снижение частоты лучевых маркеров (хромосомных обменов) приблизительно в 7,2 раза, что указывает на радиопротекторное действие МГК на генетическом уровне клеток человека. По нашему мнению, aberrации хромосомного типа более значимы для оценки канцерогенного риска по сравнению с хроматидными (индуцированные химическими либо вирусными агентами). Наиболее иллюстративно зависимость снижения частоты лучевых маркеров (дицентриков и центрических колец) под влиянием радиомодификатора МГК в немалигнизированных клетках больных с ППГЖ представлена на рисунке.

Предварительно можно сделать вывод, что препарат МГК влияет на радиочувствительность лимфоцитов крови больных ППГЖ, способствуя снижению уровня индуцированных aberrаций хромосом, в том числе за счет лучевых маркеров. Наиболее эффективно радиозащитное действие МГК проявляется при малых концентрациях препарата (2,0 мкг/мл крови). С учетом его антиоксидантных свойств полученные цитогенетические данные аргументируют существенную роль оксидативного статуса клеток в формировании их хромосомной нестабильности.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Дёмина Э.А. Хромосомные аномалии в лимфоцитах крови первичных онкологических больных в послечернобыльском периоде. *ScienceRise: Biological Science*. 2016. № 1. С. 20–26.
2. Kolusayin Ozar M.O., Orta T. The use of chromosome aberrations in predicting breast cancer risk. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2005. **24**, № 2. P. 217–222.
3. Макконки Э. Геном человека. Москва: Техносфера, 2008. 288 с.
4. Дёмина Э.А., Бариляк И.Р. Генетические основы рака. *Проблеми екол. та мед. генетики і клін. імунології*. 2009. Вип. 1–2. С. 63–73.
5. Гриневич Ю.А., Барабой В.А. Новообразовательный процесс и стрессовая патология. Киев: Логос, 2010. 156 с.
6. Хансон Л.П., Евтушенко В.И. Клеточные и молекулярные механизмы радиационного канцерогенеза. *Вопр. онкол.* 2006. **52**, № 1. С. 3–11.
7. Гофман Дж. Чернобыльская авария: радиационные последствия для настоящего и будущего поколений. Минск: Высш. шк., 1994. 574 с.
8. Seniuk O., Gorovoj L., Kovalev V.A. et al. Anticancerogenic properties of melanin-glucan complex from higher fungi. Proc. 5th Int. Med. Mushroom Congr. (Nantong, China, 5–8 Sept. 2009). Nantong, 2009. P. 142–149.
9. Shigenaga M.K., Hogen T.M., Ames B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. **91**, № 23. P. 10771–10778.

10. Silbernman M. Experimentally induced osteoarthritis in the temporomandibular joint of the mouse. *Acta Anatomica*. 1987. **96**, № 1. P. 9–24.
11. Сенюк О.Ф., Горовой Л.Ф., Ковалёв В.А. и др. Особенности и возможность химической модификации поведенческих реакций в приподнятом крестообразном лабиринте хронически облученных мышей с различной генетически детерминированной радиочувствительностью. *Радиация, биология. Радиоэкология*. 2013. **53**, № 2. С. 170–182. doi: <https://doi.org/10.7868/S0869803113010128>
12. Сенюк О.Ф., Горовой Л.Ф., Паламар Л.А., Круль Н.И. Влияние меланин-гликоанового комплекса, выделенного из грибов трутовика, на продолжительность жизни самок мышей линии ICR. *Проблемы старения и долголетия*. 2014. **23**, № 1. С. 11–27.
13. Сенюк О.Ф., Ковалёв В.А., Круль Н.И. и др. Дистанционная передача сигналов лучевого поражения в межклеточном пространстве в организме у мышей с различным уровнем генетически детерминированной радиочувствительности. *Радиация, биология. Радиоэкология*. 2013. **53**, № 1. С. 33–46.
14. Сенюк О.Ф., Мышковский Н.М., Ивченко В.Г. и др. Перспективы использования хитин-меланин-гликоан-содержащих материалов в мероприятиях радиационной защиты. *Пробл. Чернобиля*. 2004. Вып. 14. С. 151–156.
15. Дёмина Э.А. Оценка влияния профессионального облучения на цитогенетические показатели лимфоцитов периферической крови. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2018. № 10. С. 112–119. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.112>

Поступило в редакцию 10.08.2018

REFERENCES

1. Domina, E. A. (2016). Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of primary cancer patients in the post-Chernobyl period. *ScienceRise: Biological Science*, No. 1, pp. 20-26 (in Russian).
2. Kulusayin Ozar, M. O. & Orta, T. (2005). The use of chromosome aberrations in predicting breast cancer risk. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 24, No. 2, pp. 217-222.
3. McConkie, E. (2008). *Human Genome*. Moscow: Tekhnosfera (in Russian).
4. Domina, E. A. & Barilyak, I. R. (2009). Genetic basis of cancer. *Problemy ekolohichnoi ta medychnoi henytyky i klinichnoi imunolohii*, No. 1-2, pp. 63-73 (in Russian).
5. Grinevich, Y. A. & Baraboy, V. A. (2010). *Cancer process and stress pathology*. Kiev: Logos (in Russian).
6. Hanson, L. P. & Evtushenko, V. I. (2006). Cellular and molecular mechanisms of radiation carcinogenesis. *Voprosy onkologii*, 52, No. 1, pp. 3-11 (in Russian).
7. Gofman, J. (1994). *Chernobyl accident: radiation consequences for the present and future generations*. Minsk: Vysshaya shkola (in Russian).
8. Seniuk, O., Gorovoj, L., Kovalev, V.A. et al. (2009, September). Anticancerogenic properties of melanin-glucan complex from higher fungi. *Proceedings of the 5th International Medicinal Mushroom Conference* (pp. 142-149). Nantong, China.
9. Shigenaga, M. K., Hogen, T. M. & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, No. 23, pp. 10771-10778.
10. Silbernman, M. (1987). Experimentally induced osteoarthritis in the temporomandibular joint of the mouse. *Acta Anatomica*, 96, No. 1, pp. 9-24.
11. Senjuk, O. F., Gorovoj, L. F., Kovalev, V. A. et al. (2013). Features of behavioral reactions of chronically irradiated mice in the raised crosswise labyrinth with various genetically determined radiosensitivity and possibilities of their modification by the fungal biopolymer complex. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologiya*, 53, No. 2, pp. 170-182 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.7868/S0869803113010128>
12. Seniuk, O. F., Gorovyi, L. F., Palamar, L. A. & Krul, N. I. (2014). Effects of melanin-glucan complex, isolated from polypode fungi, on the lifespan of female ICR mice. *Problemy stareniya i dolgoletiya*, 23, No. 1, pp. 11-27 (in Russian).
13. Seniuk, O. F., Kovalev, V. A., Krul, N. I. et al. (2013). Remote Signaling of radiation damage to the extracellular space in mice with various levels of genetically determined radio sensitivity. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologiya*, 53, No. 1, pp. 33-46 (in Russian).

14. Senyuk, O. F, Myshkovsky, N. M, Ivchenko, V. G, et al. (2004). Prospects for the use of chitin-melanin-glucan-containing materials for radiation protection measures. Problemy Chornobylia, Iss. 14, pp. 151-156 (in Russian).
15. Domina, E. A. (2018). Evaluation of the effect of professional irradiation on cytogenetic parameters of peripheral blood lymphocytes. Dopov. Nac. acad. nauk Ukr., No. 10, pp. 112-119 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.112>

Received 10.08.2018

Е.А. Дьоміна¹, І.І. Смоланка², В.М. Михайленко¹

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

² Національний інститут раку, Київ

E-mail: edjomina@ukr.net

ВПЛИВ МЕЛАНІН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСУ НА РАДІОЧУТЛИВІСТЬ КЛІТИН ХВОРИХ З ПЕРЕДПУХЛИННОЮ ПАТОЛОГІЄЮ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Наведено результати дослідження впливу меланін-глюканового комплексу (МГК) на радіочутливість лімфоцитів крові хворих з передпухлинною патологією грудної залози залежно від концентрації препарату. Використано тест-систему лімфоцитів периферичної крові з метафазним аналізом аберацій хромосом (24 спостереження). Показано, що МГК впливає на радіочутливість клітин крові хворих, знижуючи рівень індукованих аберацій хромосом, в тому числі променевих маркерів. Найбільш ефективна радіозахисна дія МГК виявляється при концентрації препарату 2,0 мкг/мл крові. З урахуванням його антиоксидантних властивостей отримані дані аргументують істотну роль оксидативного статусу клітин у формуванні їх хромосомної нестабільності.

Ключові слова: радіочутливість, меланін-глюкановий комплекс, передпухлинна патологія, лімфоцити, аберації хромосом, нестабільність геному.

Е.А. Domina¹, I.I. Smolanka², V.M. Mikhailenko¹

¹ R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kiev

² National Institute of Cancer, Kiev

E-mail: edjomina@ukr.net

INFLUENCE OF THE MELANIN-GLUCAN COMPLEX ON THE RADIOSENSITIVITY OF CELLS OF PATIENTS WITH PREMALIGNANT PATHOLOGY OF BREAST

The authors present their own results of studying the influence of the melanin-glucan complex (MGC) on the radiosensitivity of blood lymphocytes in patients with premalignant pathology of breast, depending on the drug concentration. A test system of peripheral blood lymphocytes was used with a metaphase analysis of chromosome aberrations (24 observations). It is observed that MGC affects the radiosensitivity of blood cells in patients by reducing the level of induced aberrations of chromosomes, including radial markers. The most effective radioprotective effect of MGC appears at a concentration of the drug of 2.0 µg/ml blood. Given its antioxidant properties, these findings confirm the essential role of the oxidative status of cells in the formation of their chromosomal instability.

Keywords: radiosensitivity, melanin-glucan complex, premalignant pathology, lymphocytes, chromosome aberrations, genome instability.