
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ *IN VITRO* ВЕРАПАМИЛА И КЕТАМИНА

**Т.В. Федорончук, С.П. Сяткин,
В.А. Фролов**

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Н.Я. Гридина

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМНУ»
04050 г. Киев, ул. Майбороды, 32, Украина

И.В. Болтина

ГП «Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя МЗО Украины»
03680, ул. Героев Оборона, 6, Украина

Исследовали цитогенетические показатели у больных с опухолями головного мозга при действии верапамила и кетамина *in vitro*. При действии веропамилом наблюдалось достоверное снижение частоты аберраций хромосом, количества анеуплоидных и полиплоидных клеток у больных со злокачественными опухолями. Существенное снижение количества анеуплоидных клеток у больных со злокачественными опухолями наблюдалось также при воздействии кетамином. Самые низкие значения количества мультиаберрантных клеток и поврежденности аберрантной клетки наблюдались у больных с доброкачественными и со злокачественными опухолями под влиянием веропамила.

Ключевые слова: кетамин, верапамил, аберрации хромосом, анеуплоидные и полиплоидные клетки, опухоли головного мозга.

Онкопатология входит в число наиболее распространенных причин смерти населения всех возрастных групп. Доказано, что опухолевым заболеваниям предшествуют повреждения генетических структур в соматических клетках, т.е. природа этих заболеваний — генетическая. М.В. Лучником [1] была выдвинута гипотеза о хромосомном цикле ДНК, согласно которой в раковых клетках сломан механизм проверки синтеза ДНК. В результате этого в клетках снижена репарация спонтанно возникающих потенциальных повреждений. Не исключено также, что «неполноценная» работа механизма проверки сама по себе может быть источником повреждений, которые при последующем делении клетки проявляются в виде аберраций хромосом.

В настоящее время на организм человека действуют множество факторов, из которых многие могут иметь мутагенное влияние. Одним из таких факторов являются фармпрепараты, которые могут обладать как мутагенными, так и антимутагенными свойствами. Поэтому важным аспектом современных исследований становится изучение влияния фармпрепаратов на организм онкологических больных.

Целью работы стало исследование влияния верапамила и кетамина *in vitro* на цитогенетические показатели у больных с опухолями головного мозга.

Материалы и методы. В эксперименте использовали кровь больных с опухолями головного мозга. В первой группе было 12 лиц с доброкачественными диагнозами — средний возраст 50 лет. Во второй группе было 15 респондентов со злокачественными опухолями — средний возраст 45,1 год.

Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов хромосом было проведено стандартным полумикрометодом с модификациями, принятыми в лаборатории мутагенеза. Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и учет aberrаций хромосом проводили общепринятыми способами. При подсчете количества анеуплоидных клеток учитывали метафазы гипоплоидные — от 29 до 42 хромосом и гиперпloidные — более 49 хромосом. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критериев Стьюдента.

Осуществляли воздействие *in vitro* 0,25% раствором верапамила (в разведении 1 : 1000), 1%-м раствором натрия АТФ (в разведении 1 : 1000) и раствором кетамина (50 мг/мл) в разведении 1 : 1000. Все рабочие растворы готовили непосредственно перед культивированием и вносили по 10 мкл каждого препарата в культуру лимфоцитов периферической крови больных.

Поскольку некоторые концентрации вносимого вещества могут препятствовать делению клеток (проявлять токсичность), было целесообразно добавлять его после того, как клетки пройдут стадию G₀, т.е. через 36 часов после начала культивирования. Это условие выполнялось неукоснительно.

Результаты. Хромосомные изменения являются индивидуальными, сигнальными, генетическими проявлениями изменчивости клеток, и их частота в опухоли отображает сложность одновременных изменений многих структурных и функциональных особенностей генов. Исходя из этого, делается вывод, что хромосомные aberrации — это маркеры генных изменений, а рак — результат мутации генов. При этом высказывается предположение, что хромосомные перестройки в индукции канцерогенеза играют большую роль, чем генные мутации. Это основано на способности некоторых канцерогенов не вызывать генных мутаций. Частота aberrаций хромосом при воздействии препаратами приведена в табл. 1.

Таблица 1

Частота aberrаций хромосом (%) при действии препаратов у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без препаратов		6,24 ± 0,73	8,80 ± 0,65*
Препараты	Верапамил	5,90 ± 0,95	6,83 ± 0,75 ^а
	Натрий АТФ	6,50 ± 1,23	8,89 ± 1,50
	Кетамин	7,83 ± 1,77	8,89 ± 1,50

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^а — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без препаратов.

В контрольном варианте (без добавок) наблюдается статистически достоверная разница между частотой aberrаций у больных с доброкачественными и злока-

чественными опухолями. Веропамил существенно снижает частоту aberrаций хромосом у больных со злокачественными опухолями. У больных с доброкачественными опухолями частота aberrаций хромосом также снижается, однако статистически не достоверно. Самая низкая частота aberrаций хромосом соответствует группе, на которую действовали веропамилом.

Сохранение диплоидного хромосомного набора служит необходимым условием нормальной жизнедеятельности соматической клетки. Этот процесс обеспечивается специальной генетической программой, которая направлена на предупреждение преждевременного расхождения хромосом — причину образования анеуплоидного кариотипа клетки. Анеуплоидия свидетельствует о генетической нестабильности клетки. Это обусловлено тем, что в анеуплоидных клетках изменяется последовательность нормального синтеза ДНК. Скорее всего в ходе деления происходит экспрессия потенциальных повреждений клеточного аппарата, который отвечает за расхождение хромосом. В результате этого накопленные клетками потенциальные повреждения реализуются в числовые нарушения хромосом [2].

Корреляция числовых нарушений определенных хромосом с опухолевыми фенотипами свидетельствует об огромном значении этих аномалий и в канцерогенезе [3; 4]. В табл. 2 представлены данные относительно количества анеуплоидных клеток.

Таблица 2

Количество анеуплоидных клеток (%) при действии препаратов у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без препаратов		13,30 ± 1,03	17,75 ± 0,87*
Препараты	Веропамилом	11,15 ± 1,27	12,17 ± 2,16 ^а
	Натрий АТФ	14,44 ± 1,85	14,50 ± 1,76
	Кетамином	11,67 ± 1,69	13,94 ± 1,07 ^а

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^а — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без препаратов.

Данные относительно количества анеуплоидных клеток у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями достоверно отличаются, что не противоречит литературным данным [3; 4; 5].

Статистически достоверное снижение количества анеуплоидных клеток наблюдается у больных со злокачественными опухолями при действии и веропамила и кетамина, что требует дополнительных исследований относительно антимуtagenных свойств этих препаратов.

Полиплоидия, являясь крайним проявлением дисбаланса хромосом, у человека приводит к остановке онтогенеза на ранних этапах [6]. Выявлена позитивная корреляционная связь между общим количеством aberrантных, полиплоидных, гиперполиплоидных клеток и количеством, а главное — характером клонов аномальных клеток в лимфоцитах периферической крови, типом и стадией опухоле-

вого процесса у больных раком молочной железы и желудочно-кишечного тракта [7]. М.М. Виленчик [8] связывает полиплоидию с уменьшением митотического потенциала при делении.

Количество полиплоидных клеток представлено в табл. 3.

Таблица 3

Количество полиплоидных клеток (%) при действии препаратов у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без препаратов		0,31 ± 0,13	1,19 ± 0,33*
Препараты	Веропамилом	0,16 ± 0,16	0,29 ± 0,17 ^á
	Натрий АТФ	0,56 ± 0,39	1,00 ± 0,50
	Кетамином	0,56 ± 0,39	1,74 ± 0,86

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^á — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без препаратов.

Из данных табл. 3 видна статистически достоверная разница между количеством полиплоидных клеток у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями.

Веропамил достоверно снижает количество полиплоидных клеток при злокачественных опухолях. При доброкачественных опухолях самые низкие значения этого показателя также наблюдали в группе больных при использовании веропамила.

Возникновение мультиабберрантных клеток может привести к активации протоонкогенов. В результате этого может возникнуть опухолевый процесс. Наличие мультиабберрантных клеток свидетельствует также и об изменениях в системе репарации [9].

Из данных табл. 4 видно, что веропамил снижает количество мультиабберрантных клеток в 2 раза как при доброкачественных, так и при злокачественных опухолях.

Таблица 4

Количество мультиабберрантных клеток (%) при действии фармпрепаратов у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без препаратов		1,38 ± 0,35	1,94 ± 0,32
Препараты	Веропамилом	0,77 ± 0,27 ^á	0,98 ± 0,40 ^á
	Натрий АТФ	1,67 ± 0,67	2,00 ± 0,70
	Кетамином	2,78 ± 0,87	3,48 ± 1,21

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^á — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без препаратов.

Спектр абберраций хромосом представлен у обследуемых больных в основном одиночными и парными фрагментами (делециями). Однако есть показатель, достоверное снижение которого при действии веропамила представлено в табл. 5.

Таблица 5

**Количество обменов (%) при действии препаратов
у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями**

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без добавок		0,37 ± 0,18	0,63 ± 0,18
Модификация	Веропамилом	0*	0 ^а
	Натрий АТФ	0,56 ± 0,39	1,00 ± 0,50
	Кетамином	0,28 ± 0,28	1,74 ± 0,86

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^а — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без добавок.

Степень поврежденности aberrантной клетки отображает другой показатель, который определяется как среднее количество aberrаций на aberrантную клетку, или ПАК (поврежденность aberrантной клетки). Цитогенетические критерии частоты aberrаций хромосом, количество aberrаций на aberrантную клетку (ПАК) и распределения хромосомных aberrаций в рамках клеточной популяции могут характеризовать разные стороны индуцируемого мутагенеза. Некоторые мутагены способны сильнее влиять на частоту клеток с aberrациями, в то время как другие способны индуцировать новые повреждения в уже поврежденных клетках [10]. Рост частоты aberrаций не всегда сопровождается аналогичными изменениями среднего количества aberrаций на aberrантную клетку. Наоборот, при почти неизменных значениях частоты aberrаций может наблюдаться рост количества aberrаций на aberrантную клетку [10].

Показатель ПАК отображен в табл. 6.

Таблица 6

**Показатель ПАК (поврежденность aberrантной клетки) при действии препаратов
у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями**

Показатели		Больные с опухолями	
		доброкачественными	злокачественными
Без добавок		1,90 ± 0,41	2,10 ± 0,32
Модификация	Веропамилом	1,70 ± 0,53	1,80 ± 0,40
	Натрий АТФ	1,81 ± 0,70	1,92 ± 0,68
	Кетамином	1,84 ± 0,70	2,78 ± 1,08

Примечание: * — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными с доброкачественными опухолями, ^а — $P \leq 0,05$ по сравнению с данными без добавок.

Из данных табл. 6 видно, что самые низкие показатели ПАК были при действии веропамила в крови больных как с доброкачественными, так и со злокачественными опухолями.

Выводы. При воздействии веропамилом наблюдалось достоверное снижение частоты aberrаций хромосом, количества анеуплоидных и полиплоидных клеток, а также обменов у больных со злокачественными опухолями.

Кроме того, достоверное снижение количества анеуплоидных клеток у больных со злокачественными опухолями наблюдалось также и при действии кетамина.

Следует отметить, что самые низкие значения количества мультиаберрантных клеток и ПАК (поврежденности аберрантной клетки) наблюдали при воздействии веропамилом в группах у больных как с доброкачественными, так и со злокачественными опухолями.

Таким образом, веромапил в экспериментальном исследовании проявляет антимуtagenные/антиканцерогенные свойства. Это подтверждается достоверным снижением ряда цитогенетических показателей (частоты aberrаций хромосом, количества анеуплоидных и полиплоидных клеток и обменов) и наименьшими значениями количества мультиаберрантных клеток и степени поврежденности аберрантных клеток.

Исходя из полученных экспериментальных данных об антимуtagenном/антиканцерогенном действии веропамила, следует рекомендовать продолжить исследования для более углубленной проверки фармакологических свойств этого препарата.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Лучник Н.В. Хромосомный цикл ДНК // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1996. — Т. 36. — Вып. 6. — С. 774—779.
- [2] Шарипов И.К., Шарипов И.К., Вишневская С.С., Мергембаева Х.С. Aberrации хромосом у работников теплиц, контактирующих с пестицидами // Цитология и генетика. — 1989. — Т. 23. — № 5. — С. 60—63.
- [3] Назаренко С.А., Тимошевский В.А. Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешнесредовых факторов // Генетика. — 2005. — Т. 41. — № 3. — С. 391—395.
- [4] Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // Cell Motility and Cytoskeleton. — 2000. — V. 47. — P. 81—107.
- [5] Sen S. Aneuploidy and cancer // Curr. Opinion Oncology. — 2000. — V. 12. — P. 82—88.
- [6] Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий и генетической нестабильности у человека путем учета числовых хромосомных нарушений // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10. — № 3. — С. 530—539.
- [7] Монахов А.С., Гуляев А.В. Цитогенетическое и медико-генетическое исследование в семьях с высокой предрасположенностью к развитию рака в желудочно-кишечном тракте // Вопросы онкологии. — 1993. — Т. 39. — № 6. — С. 184—188.
- [8] Виленчик М.М. Нестабильность генома и отдельные последствия воздействия излучений. — М.: Энергоиздат, 1987. — 192 с.
- [9] Пилинская М.А., Шеметун А.М., Дыбский С.С., Редько Д.В., Знаевская И.А. Выявление мультиаберрантных лимфоцитов при цитогенетическом обследовании различных групп людей, контактирующих с мутагенными факторами // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28. — № 1. — С. 27—32.
- [10] Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Спирин Е.В. Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология.

CYTODENIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH BRAIN TUMORS UNDER TREATMENT BY VERAPAMILUM AND KETAMINE IN VITRO

T.V. Fedoronchuk, S.P. Syatkin, V.A. Frolov

Russian Peoples' Friendship University
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

N.Ya. Gridina

State Institution "Institute of Neurosurgery NAMS of Ukraine"
Mayboroda str., 32, Kyiv, Ukraine, 04050

I.V. Boltina

L.I. Medvedya Institute of ecohygiene and toxycology HM of Ukraine
Geroev Obopony str., 6, Kyiv, Ukraine, 03680

There are results of analyzing of cytogenetic characteristics of patients with brain tumors under treatment by Verapamilum and Ketamine in vitro. Under the Verapamilum action it was shown sure decreasing of the chromosome aberrations frequencies just like decreasing of the aneuploid and polyploid cells quantity in patient's malignant tumors. It also was shown the substantial reduction in aneuploid cells number among tests of patients with malignant tumors under Ketamine exposure. Patients with benign or malignant tumors had the very lowest magnitudes of multyaberratic cells amount and of the extent of aberratic cell injury under the Verapamilum influence.

Key words: Ketamine, Verapamilum, chromosome aberrations, aneuploid and polyploid cells, brain tumors