

**მაგისტრანტი:** თორაძე ლიანა

**სამაგისტრო თემა:**

მეტალთა იონებისა და რეგულატორული ოლიგოპეპტიდების გავლენა გენომური პარამეტრების ცვალებადობაზე *in vitro* უჯრედულ კულტურებში

„ Influence of metal ions and regulatory oligopeptides on variability of genomic parameters in *in vitro* cell cultures“

**ხელმძღვანელები:** თსუ გენეტიკის კათედრის ასოც. პროფესორი თინათინ ჯოხაძე; ასისტენტ-პროფ. მაია გაიოზიშვილი

### **ანოტაცია**

ორგანიზმზე მეტალთა იონების მაღალი კონცენტრაციებით ზემოქმედებისას თავს იჩენს ნეგატიური ეფექტები (ზოგადტოქსიკური, კანცეროგენული, მუტაგენური), რაც პირველ რიგში გენომზე (ეუკარიოტების შემთხვევაში - ქრომატინზე) მათი დამაზიანებელი გავლენით არის განპირობებული. შესაბამისად, მძიმე მეტალთა იონებით გარემოს მზარდი დაბინძურების პირობებში გენომზე მათი გავლენის შეფასება ძალზე აქტუალურია, ამასთან, აუცილებლად გასათვალისწინებელია გენომის იმ ეპიგენეტიკური ცვლილებების ხასიათი, რასაც ადგილი აქვს ონტოგენეზის მსვლელობაში. ეპიგენეტიკური ცვალებადობა ექვემდებარება განსხვავებული ბუნების ფაქტორთა მამოდიფიცირებელ ზეგავლენას, რაც თავის მხრივ, აისახება გენომის მდგომარეობის ფუნქციური მაჩვენებლების ცვალებადობაზე და გენომზე მიზანმიმართული ზემოქმედების პერსპექტივებს და დაბერების პროცესში შეცვლილი გენომური პარამეტრების კორექციის შესაძლებლობებს ქმნის.

ქსენობიოტიკების გენეტიკური ეფექტების შეფასებისას გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვს ისეთი ტესტ-სისტემის შერჩევას, რომელიც საშუალებას იძლევა როგორც უჯრედებზე დამაზიანებელი აგენტის ხანგრძლივი ზემოქმედების ეფექტის შეფასების, ისე საბოლოო შედეგზე ქრომატინის ეპიგენეტიკური სურათის ცვალებადობის გათვალისწინებისა. ამ თვალსაზრისით, როგორც ტესტ-სისტემა, პერსპექტიულია ხანდაზმულ ინდივიდთა ლიმფოციტების ხანმოკლე მიტოგენტიმულირებული კულტურათა და ახალგაზრდა ინდივიდთა ლიმფოციტების პროლონგირებული - 144-საათიან კულტურათა უჯრედები. ცნობილია, რომ ხანგრძლივი კულტივირებისას ახალგაზრდა ინდივიდთა უჯრედების ქრომატინი, ისევე როგორც ხანდაზმულ ინდივიდთა ხანმოკლე კულტურათა უჯრედების ქრომატინი, ხასიათდება ეპიგენეზური ცვალებადობის გარკვეული სურათით, განიცდის ჰეტეროქრომატინიზაციას. ეს უჯრედული

ტესტ-სისტემა, მსგავსად ხანდაზმულ ინდივიდთა უჯრედებისა, ხასიათდება სპონტანური მუტირების მაღალი დონით.

ჩატარებულია მძიმე მეტალთა - ნიკელის, კობალტისა და თუთიის იონების (გამოყენებული იყო ამ მეტალთა ქლორიდების  $10^{-4}$  მოლარობის ხსნარები) დამაზიანებელი გენეტიკური ეფექტის შედარებითი კვლევა ხანდაზმულ ინდივიდთა ლიმფოციტების ხანმოკლე - 72 საათიან კულტურათა უჯრედებზე მათი განცალკევებული ზემოქმედებისა და გერიატრიულ პრაქტიკაში გამოყენებული პეპტიდური ბიორეგულატორების ლივაგენისა და ეპიტალონის მამოდიფიცირებელი ზეგავლენის პირობებში. მეტალთა დამაზიანებელი მოქმედების შეფასება ხდებოდა ქრომოსომული აბერაციებისა და ფრაგილური საიტების აღრიცხვის გზით. ნაჩვენებია, რომ ამ სისტემაში ტესტირებული სამივე მეტალის დამაზიანებელი ეფექტი მნიშვნელოვნად აღემატება კონტროლის სახით გამოყენებულ ახალგაზრდა ინდივიდთა (18-27 წლის) ლიმფოციტების ხანმოკლე კულტურებში დაფიქსირებულ ეფექტს. მიღებული შედეგი ახსნილია ხანდაზმულ ინდივიდთა უჯრედებისათვის დამახასიათებელი ჰეტეროქრომატინიზაციის მაღალი დონით, რაც ქრომოსომათა სტრუქტურული ცვლილებების სიხშირის მატების წინაპირობაა (ცნობილია, რომ ქრომოსომათა დარღვევები უპირატესად ჰეტეროქრომატულ უბნებში ფორმირდება). ნაჩვენებია, აგრეთვე, პეპტიდური რეგულატორების ანტიმუტაგენური აქტივობა, რაც ტესტირებული მეტალებით ინდუცირებული ქრომოსომათა სტრუქტურული დარღვევების სიხშირის მკვეთრ დაქვეითებაში გამოიხატა, და რასაც ადგილი ჰქონდა როგორც ხანდაზმულ ინდივიდთა, ისე საკონტროლო ჯგუფის ახალგაზრდა ინდივიდთა კულტურებში. ლივაგენისა და ეპიტალონის ანტიმუტაგენური ეფექტი ახსნილია ქრომატინზე მათი მადეკონდენსირებელი ზემოქმედებით, რაც რეპარაციის ფერმენტების ეფექტური მუშაობის წინაპირობას ქმნის.

ჩატარებულია, აგრეთვე, მეტალთა იონების დამაზიანებელი მოქმედების შედარებითი შესწავლა მეორე უჯრედული ტესტ-სისტემის - ლიმფოციტების პროლონგირებული კულტურების გამოყენებით, რომელიც ასევე ჰეტეროქრომატინიზაციისა და სპონტანური მუტირების მაღალი დონით ხასიათდება, და ხანდაზმულ ინდივიდთა ხანმოკლე უჯრედულ ტესტ-სისტემაში. ცდების ამ ვარიანტში ტესტირებისათვის შერჩეული იყო სპილენძისა და კადმიუმის იონები, რომლებიც ქრომატინის სტრუქტურულ მოდიფიკაციაზე განსხვავებული ზემოქმედებით ხასიათდებიან, ნაჩვენებია, რომ ამ მეტალთა ეფექტი მაღალი მუტაბილურობის უჯრედულ სისტემებში განსხვავებულია - სპილენძი ზრდის სპონტანური მუტირების დონეს ორივე ტესტურ სისტემაში, კადმიუმი კი, ასევე ორივე ტესტ-სისტემაში, ზეგავლენას არ ახდენს სპონტანურად ფორმირებულ ქრომოსომულ მუტაციათა დონეზე. მიღებული შედეგები აიხსნება ქრომატინზე ამ მეტალთა

განსხვავებული ზემოქმედებით. კერძოდ, სპილენძი ზრდის ქრომატინის კონდენსაციის ხარისხს, და, შესაბამისად, მუტირების სიხშირესაც, კადმიუმისათვის კი იწვევს ქრომატინის დეკონდენსაციას, რის გამოც სპონტანური მუტირების მაჩვენებელი არ იცვლება.

მიღებული შედეგების საფუძველზე კეთდება დასკვნა ადამიანზე ქსენობიოტიკების დამაზიანებელი მოქმედების სრულფასოვანი შეფასებისას და სამკურნალწამლო პრეპარატების დოზირების კორექციისათვის უფროს ასაკობრივ ჯგუფთან მიმართებაში, როგორც ხანდაზმულ ინდივიდთა ხანმოკლე მიტოგენ-სტიმულირებული ლიმფოციტური კულტურების ტესტური სისტემის, ისე პროლონგირებულ კულტურათა *in vitro* დაბერების მოდელურ სისტემის გამოყენების მიზანშეწონილობის შესახებ.

### **Abstract**

Exposure to high concentrations of metal ions in the body has negative effects (general toxic, carcinogenic, mutagenic), which is primarily due to their damaging effect on the genome (in the case of eukaryotes - on chromatin). Consequently, in the conditions of increasing pollution of the environment with heavy metal ions, the assessment of their impact on the genome is very important, however, the nature of the epigenetic changes in the genome that take place during ontogenesis must be taken into account. Epigenetic variability is subject to the modifying influence of factors of different nature, which in turn reflects on the variability of functional parameters of the genome and the intended effects on the genome and creates opportunities for the correction of genomic parameters altered during aging.

When evaluating the genetic effects of xenobiotics, it is crucial to select a test system that allows both the long-term effects of the damaging agent on the cells to be evaluated and the variability of the epigenetic picture of chromatin to be considered. In this respect, as a test system, short-term mitogen-stimulated cultures of lymphocytes in older individuals and prolonged 144-hour cultures of lymphocytes in young individuals are promising. It is known that during long-term cultures, chromatin of young individual cells, as well as chromatin of cells of short-term cultures of older individuals, characterized by a certain picture of epigenetic variability, undergo heterochromatinization. This cellular test system, like the cells of older individuals, is characterized by high levels of spontaneous mutation.

Was performed a comparative genetic study of the damaging genetic effects of heavy metals - nickel, cobalt and zinc ions ( $10^{-4}$  molar solutions of these metal chlorides were used) on short-term 72-hour culture cells of older individuals lymphocytes, under their separate exposure and under the modifying effect of the

peptide bioregulators Livagen and Epithalon used in geriatric practice. The damaging effects of metals were assessed by recording chromosomal aberrations and fragile sites. It has been shown that the damaging effect of all three metals tested in this system is significantly greater than the effect observed in short-term cultures of lymphocytes in young individuals (18-27 years old) used as controls. The result is explained by the high level of heterochromatinization characteristic of cells of older individuals, which is a prerequisite for the increase in the frequency of structural changes in chromosomes (it is known that chromosomal abnormalities occur predominantly in heterochromatic regions). The antimutagenic activity of peptide bioregulators has also been shown to be marked by a sharp decrease in the frequency of structural disorders of chromosomes induced by tested metals, which has occurred in the cultures of both older individuals and in the control group of younger individuals. The antimutagenic effects of Livagen and Epithalon are explained by their decondensational effects on chromatin, which is a prerequisite for the effective functioning of reparative enzymes.

A comparative study of the damaging effects of metal ions has also been performed using a second cell test system - prolonged cultures of lymphocytes, which is also characterized by high levels of heterochromatinization and spontaneous mutation, and in the short cell test system of older individuals. Copper and cadmium ions, which have different effects on the structural modification of chromatin, were selected for testing in this version of the experiment. It is shown that the effect of these metals is different in high-mobility cell systems. Does not occur at the level of spontaneously formed chromosomal mutations. The results obtained are explained by the different effects of these metals on chromatin. In particular, copper increases the degree of chromatin condensation, and therefore the frequency of mutations, while for cadmium it causes chromatin decondensation, which is why the rate of spontaneous mutation does not change.

Based on the obtained results, a conclusion is made on the full evaluation of the damaging effect of xenobiotics on humans and on the dosage adjustment of drugs for the older age group, both for the use of short-term mitogen-stimulated lymphocyte test systems in the elderly and for *in vitro* prolongation of prolonged cultures.