

О. В. Шеметун, О. О. Талан

## Дослідження участі оксидативного стресу в розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

*Проведено моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка з використанням змішаної культури опромінених *in vitro* в дозі 1 Гр та неопромінених лімфоцитів периферичної крові людини різної статі. Визначено частоту аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках без/при дії антиоксидантного вітамінного препарату. Встановлено, що введення антиоксиданту в змішану культуру перед культивуванням запобігає розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка, що доводить участь оксидативного стресу в механізмі його розвитку.*

Радіаційно-індукований ефект свідка (bystander effect) — пошкодження в клітинах, що не зазнали безпосереднього опромінення, однак знаходились неподалік від опромінених клітин [1], — належить до немішеневих ефектів дії радіації і має провідне значення для реалізації медичних наслідків опромінення людини. Механізм розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка остаточно не з'ясований. Припускається, що в тканинах, де клітини контактують між собою, пошкоджувальний сигнал з опромінених до неопромінених клітин передається через міжклітинні з'єднання, а в тканинах, де такого контакту нема, — через вивільнення з опромінених клітин в навколочлітинне середовище цитокінів і факторів, що сприяють розвитку вторинного оксидативного стресу в неопромінених клітинах, який індукує ефект свідка [2–6].

Метою роботи було визначення частоти аберацій хромосом у неопромінених клітинах-свідках при дії антиоксидантного препарату для встановлення участі оксидативного стресу в механізмі розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Матеріалом дослідження слугували лімфоцити периферичної крові шести волонтерів, які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенами. Дослідження проводили методом моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка в умовах *in vitro* в змішаних культурах опромінених та неопромінених лімфоцитів периферичної крові людини, що розрізнялись за цитогенетичними маркерами статі [7, 8]. Цільну кров опромінювали в дозі 1 Гр на установці РУМ-17 (напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм + Al 1 мм, фокусна відстань 50 см, потужність дози 0,415 Гр/хв). Для зменшення оксидативного пошкодження ДНК в неопромінених клітинах-свідках використовували антиоксидантний препарат, що містить водорозчинні форми вітамінів Е (токоферолу), С (аскорбінової кислоти) у концентраціях 40 мг/мл та А (ретинолу) у концентрації 20 мг/мл. Вибір непрямого методу встановлення участі оксидативного стресу в механізмі розвитку ефекту свідка зумовлений неможливістю прямого біохімічного визначення показників оксидативного стресу при його моделюванні внаслідок неможливості розрізнення популяцій опромінених клітин-мішеней і неопромінених клітин-свідків. Препарат вносили в концентрації 40 мкг/мл у змішані культури опромінених і неопромінених лімфоцитів пе-

ред їх культивуванням. Згідно з результатами попередніх досліджень, вказана концентрація антиоксиданта не справляла токсичного впливу на неопромінені лімфоцити і виявляла найкращий антимуtagenний ефект при їх опроміненні *in vitro* [9, 10].

Цитогенетичний аналіз проводили з використанням диференційного G-зabarвлення метафазних хромосом за допомогою барвника Гімза та трипсину [11] під мікроскопами зі збільшенням 1000. Аберації хроматидного (хроматидні розриви, обміни) і хромосомного (дицентричні й кільцеві хромосоми, транслокації, пара- й перичентричні інверсії, інсерції, термінальні та інтерстиціальні делеції) типів реєстрували відносно до міжнародної номенклатури ISCN-2013 [12]. У ході досліджень було проаналізовано 6929 клітин. Отримані дані опрацьовували методом порівняння середніх величин за Стюдентом–Фішером [13].

Цитогенетичний аналіз неопроміненних лімфоцитів периферичної крові людини, культивованих у змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненними *in vitro* в дозі 1,0 Гр, показав, що частота аберантних клітин та рівень аберацій хромосом ( $5,34 \pm 0,49/100$  метафаз) в клітинах-свідках перевищували показники контрольних культур ( $p < 0,001$ ) (табл. 1). Застосування антиоксидантного препарату в дозі 40 мкг/мл перед сумісним культивуванням лімфоцитів спричинило зниження середнього рівня аберацій хромосом у неопроміненних клітинах-свідках до  $2,70 \pm 0,35/100$  метафаз ( $p < 0,001$ ), що не відрізнявся від показників контролю ( $p > 0,05$ ).

Аналіз спектра аберацій хромосом показав, що 74 % серед зареєстрованих пошкоджень в неопроміненних клітинах при їх культивуванні в змішаних культурах з опроміненними *in vitro* лімфоцитами становили аберації хроматидного типу, індукція яких є наслідком хромосомної нестабільності та притаманна для реалізації ефекту свідка на цитогенетичному рівні. Їх частота дорівнювала  $3,97 \pm 0,42/100$  метафаз і перевищувала показники контролю ( $p < 0,001$ ) (табл. 2).

Використання антиоксидантного препарату дало змогу знизити індуковану ефектом свідка частоту аберацій хроматидного типу до рівня, що не мав статистично істотної різниці з контрольним ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 1. Основні цитогенетичні показники в неопроміненних клітинах-свідках при культивуванні з опроміненними в дозі 1,0 Гр лімфоцитами при дії антиоксидантного препарату

Варіант дослідю	Кількість проаналізованих клітин	Частота аберантних клітин, %	Рівень аберацій хромосом на 100 клітин	
			середній	мінімальний–максимальний
Контроль	2629	$2,06 \pm 0,33$	$2,06 \pm 0,33$	0,96–3,50
Клітини-свідки	2116	$5,34 \pm 0,49$	$5,34 \pm 0,49$	4,17–7,63
Клітини-свідки + + антиоксидантний препарат	2184	$2,70 \pm 0,35$	$2,70 \pm 0,35$	0,91–5,00

Таблиця 2. Частота аберацій хроматидного і хромосомного типів у неопроміненних клітинах-свідках при культивуванні з опроміненними в дозі 1,0 Гр лімфоцитами при дії антиоксидантного препарату

Варіант дослідю	Частота аберацій на 100 клітин	
	хроматидного типу	хромосомного типу
Контроль	$0,87 \pm 0,22$	$1,19 \pm 0,25$
Клітини-свідки	$3,97 \pm 0,42$	$1,37 \pm 0,25$
Клітини-свідки + антиоксидантний препарат	$1,14 \pm 0,23$	$1,56 \pm 0,26$

Частота аберацій хромосомного типу в неопромінених клітинах-свідках дорівнювала  $1,37 \pm 0,25/100$  метафаз і не мала статистичної різниці з показниками контролю ( $p > 0,05$ ). У спектрі цих аберацій переважали делеції (80%). Їх рівень ( $1,09 \pm 0,23/100$  клітин) статистично не відрізнявся від показника в контрольних культурах лімфоцитів периферичної крові ( $p > 0,05$ ) (табл. 3).

Застосування антиоксидантного препарату не вплинуло на рівень аберацій хромосомного типу в клітинах-свідках, частота яких статистично вірогідно не відрізнялась від показника при окремому культивуванні змішаних культур опромінених і неопромінених лімфоцитів ( $p > 0,05$ ).

Частота стабільних (транслокацій, інверсій) і нестабільних (дицентриків, кільцевих хромосом) маркерів дії радіації в клітинах-свідках не мала істотної різниці з показниками контрольних культур та з результатами, отриманими при застосуванні антиоксидантного препарату ( $p > 0,05$ ). Отримані нами дані узгоджуються з результатами наших попередніх досліджень, в яких показано, що радіаційно-індукований ефект свідка не впливає на індукцію цитогенетичних маркерів дії радіації [14].

Аналіз індивідуальних рівнів аберацій хромосом показав, що ефект свідка зареєстровано в усіх обстежених волонтерів (табл. 4). Частота аберацій хромосом у клітинах-свідках відзначалась у межах від 4,23 до 6,67 на 100 клітин і перевищувала показники контрольних культур від 0,96 до 3,50 на 100 метафаз неопромінених лімфоцитів ( $p < 0,05$ ).

Застосування антиоксидантного препарату сприяло зниженню індивідуальних рівнів аберацій хромосом у клітинах-свідках до показників (від 1,37 до 4,25 на 100 клітин), що не мали вірогідної різниці з контролем ( $p > 0,05$ ).

Частота аберацій хромосом у неопромінених клітинах-свідках при окремому культивуванні та дії антиоксидантного препарату корелювала з рівнями аберацій хромосом у кон-

Таблиця 3. Частота аберацій хромосомного типу в неопромінених клітинах-свідках при культивуванні з опроміненими в дозі 1,0 Гр лімфоцитами при дії антиоксидантного препарату

Варіант досліджу	Частота аберацій на 100 клітин		
	інтерстиціальних і термінальних делецій	дицентриків і кільцевих хромосом	транслокацій та інверсій
Контроль	$0,81 \pm 0,21$	$0,11 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,12$
Клітини-свідки	$1,09 \pm 0,23$	$0,05 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,11$
Клітини-свідки + + антиоксидантний препарат	$1,10 \pm 0,22$	$0,09 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,13$

Таблиця 4. Індивідуальні частоти аберацій хромосом в обстежених волонтерів

Варіант досліджу	Частота аберацій на 100 клітин		
	контроль	клітини-свідки	клітини-свідки + антиоксидантний препарат
1	2,05	4,75	2,62
2	0,96	4,23	1,37
3	3,00	6,09	2,86
4	3,50	6,67	4,25
5	2,00	5,14	2,33
6	2,70	5,10	2,58
$M \pm m$	$2,06 \pm 0,33$	$5,34 \pm 0,49$	$2,70 \pm 0,35$

трольних культурах обстежених волонтерів. У досліді № 4 при найвищій спонтанній частоті аберацій (3,50/100 клітин) відзначено найвищій середній рівень аберацій хромосом у клітинах свідках (6,67/100 клітин) як при їх окремому культивуванні, так і застосуванні антиоксидантного препарату (4,25/100 клітин). У досліді № 2 вказані показники були найнижчими. На нашу думку, це може бути зумовлено індивідуальними особливостями роботи систем репарації ДНК у обстежених волонтерів.

Таким чином, в результаті цитогенетичного аналізу неопромінених лімфоцитів периферичної крові людини, що культивувались в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 1,0 Гр, зареєстровано радіаційно-індукований ефект свідка. Частота аберацій хромосом в клітинах-свідках перевищувала показники контрольних культур неопромінених лімфоцитів ( $p < 0,05$ ) за рахунок підвищеної частоти хроматидних розривів. Застосування антиоксидантного препарату у концентрації 40 мкг/мл забезпечило зниження середнього рівня аберацій хромосом в клітинах-свідках до рівня, що не мав статистично-вірогідної різниці з контролем. Отриманий результат свідчить, що в механізмі розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка бере участь оксидативний стрес, дія якого нівелюється впливом вітамінів А, С, Е, які входять до складу антиоксидантного препарату.

1. *Литтл Д. Б.* Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2007. – 47, № 3. – С. 262–272.
2. *Wright E.* Mechanisms of non-targeted effects (14 червня 2010) / Mode of access: [https://www.noteip.org/Meetings\\_and\\_events/NOTE\\_Workshops](https://www.noteip.org/Meetings_and_events/NOTE_Workshops).
3. *Lehnert B. E., Iyer R.* Exposure to low-level chemicals and ionizing radiation: reactive oxygen species and cellular pathways // Hum. Exp. Toxicol. – 2002. – 21, No 2. – P. 65–69.
4. *Iyer R., Lehnert B. E.* Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles // Cancer Res. – 2000. – 60. – P. 1290–1298.
5. *Шеметун О. В., Пилинська М. А.* Радіаційно-індукований ефект свідка // Цитологія і генетика. – 2008. – 41, № 4. – С. 66–71.
6. *Копораска М.* The influence of antioxidant vitamins on the radiation-induced bystander effect in normal human lymphocytes // Матеріали 35-ї щоріч. конф. Європ. тов-ва з радіаційн. досліджень “Сучасні проблеми радіаційних досліджень”. – Київ, 2007. – С. 94–101.
7. *Шеметун О. В., Талан О. О., Пилинська М. А.* Модель для дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка з використанням лімфоцитів периферичної крові людини // Журн. АМН України. – 2006. – 12, № 3. – С. 556–565.
8. *Методика цитогенетичного дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка:* Інформ. лист / Упоряд., Наук. центр радіаційної медицини АМН України. – Київ, 2007. – 4 с.
9. *Шеметун О. В.* Цитогенетичні показники в опромінених *in vitro* соматичних клітинах людини при дії антиоксидантного вітамінного препарату // Архів клініч. та експерим. медицини. – 2012. – 21, № 2. – С. 204–206.
10. *Шеметун О. В.* Модифікація радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферичної крові людини з використанням антиоксидантного вітамінного препарату // Доп. НАН України. – 2013. – № 9. – С. 191–195.
11. *Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації /* Упоряд., КМАПО МОЗ України. – Київ. – 2003. – 23 с.
12. *An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013) /* Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel: Karger, 2013. – 140 p.
13. *Атраментова Л. А., Утевская О. М.* Статистические методы в биологии. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
14. *Шеметун Е. В., Пилинская М. А., Талан О. А. и др.* Исследование радиационно-индуцированного эффекта свидетеля // Архів клініч. та експерим. медицини. – 2012. – 21, № 2. – С. 255–256.

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 13.01.2014

Е. В. Шеметун, О. А. Талан

**Исследование участия оксидативного стресса в развитии радиационно-индуцированного эффекта свидетеля в лимфоцитах периферической крови человека**

*Проведено моделирование радиационно-индуцированного эффекта свидетеля с использованием смешанной культуры облученных *in vitro* в дозе 1 Гр и необлученных лимфоцитов периферической крови человека, различающихся цитогенетическими маркерами пола. Определена частота aberrаций хромосом в необлученных клетках-свидетелях без/при действии антиоксидантного витаминного препарата. Установлено, что введение антиоксиданта в смешанную культуру перед культивированием предотвращает развитие радиационно-индуцированного эффекта свидетеля, что свидетельствует об участии оксидативного стресса в механизме его развития.*

O. V. Shemetun, O. O. Talan

**Research of oxidative stress participation in the development of the radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes**

*The radiation-induced bystander effect is modeled with the help of a mixed cell culture consisting of peripheral blood lymphocytes obtained from individuals of different sexes irradiated *in vitro* in a dose of 1 Gy and unirradiated. The frequency of chromosome aberrations in unirradiated bystander-cells without and under the action of an antioxidant vitaminic medical product had been determined. It had been found that the impact of the antioxidant into the mixed culture before the cultivation prevented the occurrence of the radiation-induced bystander effect. The data obtained testify to the participation of oxidative stress in the mechanism of bystander effect development.*