

О. В. Шеметун

Індукція ефекту свідка в соматичних клітинах людини при дії рентгенівського опромінення *in vitro* в малих та високих дозах

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

*Досліджено радіаційно-індукований ефект свідка з використанням змішаної культури лімфоцитів крові людини та рентгенівського опромінення *in vitro* в дозах 0,25 та 1,00 Гр. Встановлено, що рівень аберацій хромосом у неопромінених лімфоцитах при культивуванні з опроміненими клітинами перевищував відповідну частоту хромосомних аберацій у контрольних змішаних культурах неопромінених лімфоцитів. Частота аберацій хромосом у клітинах-свідках зростала зі збільшенням дози опромінення сумісної популяції лімфоцитів за рахунок індукції хроматидних розривів.*

Ефектом свідка (bystander effect) називають пошкодження в клітинах, що не зазнали прямої дії іонізуючого випромінювання, проте знаходились поблизу опромінених клітин (у безпосередньому контакті, у межах тканини, органа чи цілісного організму). Ефект свідка супроводжується змінами у роботі окремих генів та генними мутаціями, хромосомними абераціями, адаптивним відгуком, геномною нестабільністю, клітинною загибеллю чи трансформацією [1–4]. Вказані процеси підсилюють біологічну дію іонізуючого випромінювання та можуть збільшувати ризик виникнення в людини соматичної патології і злоякісних новоутворень, що зумовлює актуальність вивчення цього феномену.

В ДУ “Науковий центр радіаційної медицини НАМН України” вивчення радіаційно-індукованого ефекту свідка розпочато в 2005 р. [5]. За цей час розроблена та впроваджена в практику наукових досліджень модель для його виявлення на цитогенетичному рівні з використанням змішаних культур опромінених та неопромінених лімфоцитів периферичної крові осіб різної статі [6, 7]. З її застосуванням проводиться дослідження закономірностей розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка в соматичних клітинах людини при опроміненні *in vitro* та *in vivo* [8–10].

Мета роботи — дослідження та порівняння цитогенетичного ефекту, індукованого в соматичних клітинах людини внаслідок ефекту свідка, при опроміненні в малих та високих дозах.

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові 10 практично здорових волонтерів середнього віку, які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенами. Дослідження проведено з використанням змішаної культури лімфоцитів, що розрізнялись за цитогенетичними маркерами статі та наявністю рентгенівського опромінення *in vitro*. Для моделювання індукції ефекту свідка при дії випромінювання застосовували рентгенівське опромінення крові в малій (0,25 Гр) та високій (1,00 Гр) дозах. Цільну венозну кров опромінювали на установці РУМ-17 (фільтри $\text{Cu } 5 \cdot 10^{-4}$ м; $\text{Al } 1 \cdot 10^{-3}$ м, потужність дози 0,415 Гр/хв).

Кров культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом [10]. При постановці змішаних культур до культуральної суміші в пробірку додавали по 0,3 мл опроміненої та не-

опроміненої крові від двох донорів різної статі. Цитогенетичний аналіз виконували із застосуванням диференційного GTG забарвлення метафазних хромосом, що дозволило ідентифікувати в досліджених клітинах усі хромосоми і виявити повний спектр хромосомних аберацій. Як цитогенетичні маркери для розрізнення лімфоцитів осіб чоловічої і жіночої статей при сумісному культивуванні використовували чоловічу (Y) та жіночі (XX) статеві хромосоми і морфологічні варіанти соматичних хромосом. Під час аналізу реєстрували аберації хроматидного (хроматидні розриви, обміни) і хромосомного (дицентричні й кільцеві хромосоми, транслокації, пара- та перичентричні інверсії, інсерції, термінальні та інтерстиціальні делеції) типів. Пошкодження хромосом та точки розривів визначали згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-2005 [12]. Загалом проаналізовано 4134 диференційно G-забарвлені клітини. Отримані дані опрацьовані з використанням методу порівняння середніх величин за Стьюдентом–Фішером.

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів, що культивувались у змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 0,25 Гр, показав, що частота абераційних клітин та рівень аберацій хромосом у клітинах-свідках статистично достовірно перевищували показники контрольних змішаних культур з неопромінених популяцій лімфоцитів ($p < 0,05$) (табл. 1). Значення індивідуального рівня частоти аберацій хромосом знаходилися в межах від 3,00 до 6,72 на 100 клітин.

Частота абераційних клітин та рівень аберацій хромосом в неопромінених лімфоцитах, що культивувались з клітинами, опроміненими в дозі 1,0 Гр, статистично достовірно перевищували контрольні дані ($p < 0,001$) та рівень показників у клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозі 0,25 Гр ($p < 0,05$), і становили $5,98 \pm 0,65$ і $6,13 \pm 0,66$ на 100 метафаз відповідно. Значення індивідуальної частоти аберацій хромосом знаходилися в межах 3,48–7,94 на 100 клітин.

Рівень аберацій хроматидного типу в неопромінених клітинах, що культивувались з клітинами, опроміненими в дозі 0,25 Гр, становив $2,11 \pm 0,43$ на 100 метафаз, що перевищувало показники контролю ($p < 0,05$) (табл. 2). Більшість цих пошкоджень було представлено хро-

Таблиця 1. Основні цитогенетичні показники в неопромінених клітинах-свідках при культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозах 0,25 і 1,00 Гр

Доза опромінення, Гр	Кількість проаналізованих клітин	Частота абераційних клітин, %	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин	
			середня	мінімальна–максимальна
0,00	1676	$2,27 \pm 0,36$	$2,27 \pm 0,36$	0,67–4,00
0,25	1137	$4,13 \pm 0,59$	$4,31 \pm 0,60$	3,00–6,72
1,00	1321	$5,98 \pm 0,65$	$6,13 \pm 0,66$	3,48–7,94

Таблиця 2. Частота аберацій хроматидного і хромосомного типів у неопромінених клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозах 0,25 і 1,00 Гр

Доза опромінення, Гр	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин	
	хроматидного типу	хромосомного типу
0,00	$1,07 \pm 0,25$	$1,20 \pm 0,27$
0,25	$2,11 \pm 0,43$	$2,20 \pm 0,43$
1,00	$3,86 \pm 0,53$	$2,27 \pm 0,41$

матидними розривами, які зустрічались з частотою $2,02 \pm 0,42$ на 100 клітин. У варіанті досліду, коли суміжна з клітинами-свідками популяція лімфоцитів була опромінена в дозі 1,00 Гр, рівень хроматидних розривів становив $3,86 \pm 0,53$ на 100 метафаз і достовірно перевищував результат, отриманий у досліді з опроміненням у дозі 0,25 Гр ($p < 0,05$).

Зростання кількості хроматидних розривів у клітинах-свідках могло бути наслідком індукції опроміненими клітинами в оточуюче їх середовище цитокінів та/чи інших факторів, що сприяли збільшенню вмісту активних форм кисню в неопромінених клітинах [13]. Це могло спричинити оксидативні пошкодження і одониткові розриви ДНК, що реалізувались на хромосомному рівні як аберації хроматидного типу [14].

У неопромінених клітинах-свідках при культивуванні в змішаних культурах з опроміненими було зареєстровано всі види аберацій хромосомного типу: термінальні та інтерстиціальні делеції, транслокації, інверсії, дицентрики, центричні хромосоми. Переважна більшість пошкоджень хромосомного типу була представлена термінальними делеціями. Значення рівня цих аберацій істотно не відрізнялися в обох варіантах опромінення ($p > 0,05$) і перевищували показник контролю ($p < 0,05$) (табл. 3). Оскільки частота іншого типу делецій — інтерстиціальних — не мала різниці з контрольною, можна припустити, що частина із зареєстрованих у неопромінених клітинах-свідках термінальних делецій насправді була наслідком окремих пошкоджень в однакових локусах обох хроматид хромосом, тобто подвійних хроматидних розривів.

Значення рівня нестабільних (дицентричних та кільцевих хромосом) та стабільних (транслокацій та інверсій) маркерів опромінення в клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозах 0,25 і 1,00 Гр, не мали істотної різниці між собою та не перевищували контрольні показники змішаних культур неопромінених лімфоцитів (див. табл. 3).

Отриманий результат підтверджує коректність проведення ретроспективної біологічної дозиметрії з використанням вказаних цитогенетичних показників, адже засвідчує неможливість їх індукції в неопромінених клітинах організму людини внаслідок ефекту свідка.

Аналіз індивідуальної частоти аберацій хромосом в неопромінених лімфоцитах обстежених волонтерів при їх сумісному культивуванні з опроміненими клітинами виявив різну здатність окремих осіб до індукції ефекту свідка. При опроміненні в дозі 0,25 Гр в культурах лімфоцитів трьох волонтерів (№№ 2, 6, 8) рівень аберацій хромосом не перевищував контрольні показники і радіоіндукованого ефекту свідка не було зареєстровано (табл. 4). Разом з тим у волонтерів №№ 3 та 10 при опроміненні в дозі 0,25 Гр рівень аберацій хромосом значно перевищував контрольні і середньогрупові показники.

Культивування неопромінених лімфоцитів з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозі 1,00 Гр, спричинило індукцію ефекту свідка у всіх обстежених осіб. При цьому в частини

Таблиця 3. Спектр аберацій хромосомного типу в неопромінених клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозах 0,25 і 1,00 Гр

Доза опромінення, Гр	Частота аберацій хромосомного типу, на 100 клітин					
	дицентриків	центричних кілець	транслокацій	інверсій	термінальних делецій	інтерстиціальних делецій
0,00	$0,06 \pm 0,06$	$0,00 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,24$	$0,12 \pm 0,08$
0,25	$0,00 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,12$	$0,00 \pm 0,00$	$1,85 \pm 0,40$	$0,09 \pm 0,09$
1,00	$0,08 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,08$	$0,07 \pm 0,07$	$1,89 \pm 0,37$	$0,15 \pm 0,11$

Таблиця 4. Індивідуальна частота аберацій хромосом у неопромінених лімфоцитах обстежених волонтерів при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозах 0,25 і 1,00 Гр

Культура лімфоцитів, № п/п	Частота аберацій хромосом (на 100 клітин) при опроміненні в дозах		
	0,00 Гр	0,25 Гр	1,00 Гр
1	1,00	4,62	7,26
2	3,00	3,33	7,94
3	2,00	6,72	6,00
4	2,00	3,00	7,44
5	2,35	5,00	5,56
6	3,00	3,16	4,38
7	2,00	4,41	3,48
8	3,00	3,18	7,83
9	2,00	4,00	7,92
10	0,67	5,78	5,22

волонтерів (№№ 3, 5, 7, 10) не відбулося зростання частоти аберацій хромосом порівняно з варіантом, коли доза опромінення становила 0,25 Гр. Виявлені відмінності між обстеженими особами в індукції ефекту свідка при дії радіації в малій та високій дозах можуть бути зумовлені міжіндивідуальною різницею в стані їх про- та антиоксидантних систем.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено підвищений рівень аберацій хромосом внаслідок індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах крові людини при культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vitro* в дозах 0,25 і 1,00 Гр. Частота аберацій хромосом у неопромінених клітинах-свідках зростала з підвищенням дози опромінення суміжної популяції клітин-мішеней за рахунок збільшення частоти хроматидних розривів ($p < 0,05$). Радіаційно-індукований ефект свідка не впливав на індукцію стабільних і нестабільних цитогенетичних маркерів дії радіації, рівень яких у клітинах-свідках не перевищував популяційний при досліджуваних дозах випромінювання ($p > 0,05$), що підтверджує правомірність їх використання з метою ретроспективної біологічної дозиметрії. Встановлено значні індивідуальні відмінності між обстеженими волонтерами за здатністю до індукції ефекту свідка при опроміненні в малих та високих дозах.

1. Литтл Д. Б. Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // Радиация, биология. Радиоэкология. – 2007. – **47**, № 3. – С. 262–272.
2. Widel M., Przybyszewski W., Rzeszowska-Wolny J. Radiation-induced bystander effect: the important part of ionizing radiation response. Potential clinical implications // Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej. – 2009. – **63**. – P. 88–94.
3. Sedelnikova O. A., Nakamura A., Kovalchuk O. et al. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models // Cancer Res. – 2007. – **67**, No 9. – P. 1–8.
4. Шеметун О. В., Пілінська М. А. Радіаційно-індукований “ефект свідка” // Цитологія і генетика. – 2007. – **41**, No 4. – С. 66–71.
5. Шеметун О. В., Пілінська М. А., Талан О. О. Підходи до виявлення радіаційно індукованого “ефекту свідка” в соматичних клітинах людини на цитогенетичному рівні // Укр. мед. вісті. – 2005. – **6**, № 1–2. – С. 427.
6. Шеметун О. В., Талан О. О., Пілінська М. А. Модель для дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка з використанням лімфоцитів периферичної крові людини // Журн. АМН України. – 2006. – **12**, № 3. – С. 556–565.
7. Методика цитогенетичного дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка: Інформ. лист / Науковий центр радіаційної медицини АМН України. – Київ, 2007. – 4 с.

8. Шеметун О. В., Талан О. О., Семіглазова Т. В., Курінний Д. А. Цитогенетичні показники в опроміненних *in vitro* лімфоцитах крові людини при їх окремому культивуванні та у змішаних культурах з неопроміненними лімфоцитами // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: Зб. наук. праць / НЦРМ АМН України. – Київ: ДІА, 2006. – Вип. 12. – С. 160–164.
9. Шеметун О. В., Талан О. О., Пільнська М. А. Дослідження радіаційно-індукованого “ефекту свідка” з використанням моделі з лімфоцитів крові людини при опроміненні *in vitro* // Журн. АМН України. – 2007. – **13**, № 3. – С. 592–599.
10. Шеметун О. В. Цитогенетичний ефект в клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами периферичної крові осіб, які зазнали опромінення *in vivo* // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2009. – Вип. 5 (92). – С. 95–102.
11. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Метод. рекомендації / КМАПО МОЗ України. – Київ, 2003. – 23 с.
12. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2005) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel: Karger, 2005. – 130 p.
13. Azzam E. I, de Toledo S. M., Little J. B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect // Oncogene. – 2003. – **22**. – P. 7050–7057.
14. Насонова Е. А., Шмакова Н. Л., Комова О. В. и др. Цитогенетические эффекты малых доз ионизирующей радиации с различной ЛПЭ в лимфоцитах периферической крови человека и возможные механизмы их реализации // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2006. – **46**, № 4. – С. 457–460.

Державна установа “Науковий центр
радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 22.02.2011

O. V. Shemetun

Induction of the bystander effect in human somatic cells by X-ray irradiation *in vitro* at low and high doses

The results of the cytogenetic investigation of the radioinduced bystander effect with the help of a mixed culture of irradiated by X-rays and unirradiated human blood lymphocytes are presented. It is shown that the level of chromosome aberrations in unexposed human lymphocytes cultivated with lymphocytes irradiated in vitro in doses of 0.25 and 1.0 Gy is significantly higher than the frequency of aberrations in control mixed cultures of unirradiated lymphocytes. The frequency of chromosome aberrations in the bystander cells elevated with increasing doses of neighboring populations of lymphocytes due to the increased induction of chromatid breaks.