

**ЭФФЕКТ
СВИДЕТЕЛЯ**

УДК 612.42:[577.2+576]:539.1.04

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО “ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ” НА МОДЕЛИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА В СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ПОЛА

© 2007 г. **И. Е. Воробцова***, **И. С. Колесникова**

*ФГУ Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт ФАЗСР,
Санкт-Петербург*

Предложен новый метод изучения радиационно индуцированного “эффекта свидетеля” – совместное культивирование лимфоцитов разнополых доноров. О наличии “эффекта свидетеля” судили по способности необлученных клеток женского/мужского донора развивать адаптивный ответ при совместном культивировании с облученными на стадии G_0 (0.05 Гр) лимфоцитами донора противоположного пола. Полученные предварительные результаты свидетельствуют о том, что как предоблученные лимфоциты, так и соседствовавшие с ними в смешанной культуре необлученные клетки оказываются более радиоустойчивыми к облучению на стадии G_1 (1.0 Гр) по критерию частоты индуцированных хромосомных аберраций. Прямой и опосредованный адаптивные ответы количественно были более выражены в лимфоцитах донора женского пола.

Человек, лимфоциты разнополых доноров, совместное культивирование, эффект свидетеля, адаптивный ответ.

Традиционно считается, что причиной различных биологических последствий действия ионизирующей радиации является повреждение уникальных жизненно-важных молекул ДНК – мишеней. В то же время мишенным механизмом не всегда можно объяснить наблюдаемые радиационные эффекты, особенно нестохастические.

В исследованиях 60-х–70-х годов ХХ в. было показано, что кроме прямого механизма действия радиации на клетки существует и опосредованный, называвшийся тогда дистанционным, гуморальным. Он выражается в том, что нарушения возникают не только в облученных клетках, но и в гуморально связанных с ними интактных. Это было установлено с помощью доступных в то время методов: диффузионные камеры [1], локальное облучение животных [2] и др.

Существование факторов, ответственных за непрямой радиационный эффект на субклеточном уровне, было показано в экспериментах на амебах [3]. С помощью трансплантационной техники были получены амебы из необлученных ядер и цитоплазм, находившихся в течение нескольких клеточных генераций в контакте с соответствующими облученными компонентами амев. “Реконструированные нормальные” амебы

отмирали быстрее, чем “естественные нормальные”. Проявлением непрямого радиационного эффекта на субклеточном уровне является и увеличение частоты ядерных мутаций в клетках при облучении α -частицами только цитоплазмы [4].

Доказательством возможности передачи информации от испытавших радиационное воздействие молекул ДНК к интактным молекулам ДНК служат результаты некоторых генетических экспериментов на дрозофиле. Так, при скрещивании облученных самцов с интактными самками в половых клетках потомства наблюдается повышенная частота рецессивных летальных мутаций не только в X-хромосоме, привнесенной в зиготу облученным самцом, но и в X-хромосоме, происходящей от необлученной самки [5, 6]. В наших исследованиях потомства облученных самцов дрозофил также было показано влияние облученной мужской половины генома на частоту спонтанных и индуцированных дополнительным облучением потомства разрывов кольцевых X-хромосом, привнесенных в зиготу от интактной самки [7].

В настоящее время опосредованный радиационный эффект приобрел название “эффекта свидетеля”. Особенностью его является то, что он наиболее выражен при слабых радиационных воздействиях. “Эффект свидетеля” широко изучается с помощью различных современных методических подходов: облучение *in vitro* отдельных

*Адресат для корреспонденции: 197758 Санкт-Петербург, Песочный, Ленинградская, 70/4; ФГУ ЦНИРРИ ФАЗСР; тел. (812) 596-87-79; факс (812) 596-67-05; e-mail: rad-gen@sertolovo.ru.

клеток микропучками заряженных частиц [8], трансплантация облученных клеток костного мозга необлученным реципиентам [9], воздействие на необлученные клетки компонентами среды от облученных [10] и др.

Мы предлагаем новый, удобный метод для изучения “эффекта свидетеля” – совместное культивирование лимфоцитов разнополюх доноров. Он дает возможность регистрировать уровень хромосомных aberrаций (ХА) в женских (ХХ) клетках при облучении мужских (ХУ) и наоборот; исследовать адаптивный ответ в необлученных лимфоцитах одного пола, культивируемых совместно с облученными в адаптирующей дозе лимфоцитами другого, изучать дозовые зависимости этих опосредованных эффектов.

В настоящей работе приводятся предварительные результаты экспериментов по изучению адаптивного ответа, проведенных на смешанной культуре лимфоцитов разнополюх доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для совместного культивирования использовали лимфоциты двух здоровых доноров: мужчины в возрасте 19 лет и женщины в возрасте 27 лет.

Эксперименты проводили в трех вариантах:

1) цельную кровь (т.е. лимфоциты в стадии G_0) женщины подвергали воздействию γ -излучения ^{60}Co в дозе 5 сГр (мощность дозы 3.2 сГр/мин) и, добавив фитогемагглютинин (ФГА), культивировали совместно с необлученной кровью мужчины в течение 5 ч при температуре 37°C. Через 5 ч совместного культивирования, т.е. на стадии G_1 клеточного цикла, лимфоциты облучали в разрешающей дозе 100 сГр рентгеновского излучения при мощности дозы 44.5 сГр/мин на аппарате РУМ-17.

2) аналогично ставили реципрокный вариант с предоблучением мужской крови в дозе 5 сГр.

3) смешанную культуру из необлученных лимфоцитов обоих доноров облучали в дозе 100 сГр рентгеновского излучения через 5 ч после начала культивирования.

После облучения в разрешающей дозе во все культуры добавляли бромдеоксиуридин (BrdU) для контроля клеточного цикла. Снятие культур проводили стандартно через 48 ч от начала культивирования в среде следующего состава: культуральная среда RPMI 1640 (Биолот) – 3.8 мл, эмбриональная телачья сыворотка (Биолот) – 0.7 мл, антибиотики (пенициллин + стрептомицин) в конечной концентрации 100 ед./мл и 100 мкг/мл, ФГА (Difco) в конечной концентрации 20 мкг/мл, BrdU в конечной концентрации 9.3 мкг/мл. За 3 ч

до окончания инкубирования в культуры вводили колцемид до конечной концентрации 0.1 мкг/мл.

Первый вариант опыта при сравнении с третьим, где оценивали исходную радиоустойчивость (РУ) клеток, давал возможность оценить прямой адаптивный ответ (ПАО) женских лимфоцитов и опосредованный адаптивный ответ (ОАО) мужских. Второй вариант, наоборот – ПАО мужских лимфоцитов и ОАО – женских.

Для сравнительной оценки цитогенетических эффектов однотипных радиационных воздействий в монокультурах по сравнению со смешанными дополнительно были поставлены следующие варианты культур женских и мужских лимфоцитов:

- 1) необлученные (монокультуры и смешанные),
- 2) облученные только в дозе 5 сГр (монокультуры и смешанные),
- 3) облученные только в дозе 100 сГр (монокультуры),
- 4) облученные сначала в адаптирующей дозе 5 сГр, а затем в разрешающей дозе 100 сГр (монокультуры).

Эти препараты находятся в процессе анализа и результаты по ним в настоящем сообщении не приводятся.

Анализ метафазных пластинок проводили на микроскопах Микромед-1 (ЛОМО, Россия) и Axioptan (Carl Zeiss, Germany), просматривая в смешанных культурах каждого варианта по 400–500 метафаз I пострадиационного митоза для каждого пола и регистрируя ХА (дицентрики, кольца, ацентрические фрагменты, маркерные хромосомы) отдельно лимфоцитах доноров женского (ХХ) и мужского (ХУ) пола. Частоту событий выражали в процентах. Для оценки достоверности различий между вариантами использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Видно, что предварительное облучение нестимулированных лимфоцитов приводит к развитию ПАО у обоих доноров: частота ХА, индуцированных облучением в разрешающей дозе 100 сГр, снижается по сравнению с таковой в варианте без предварительного облучения в малой дозе на 18.2% в мужских лимфоцитах и на 22.3% – в женских. В необлученных лимфоцитах, культивированных совместно с предварительно адаптированными клетками противоположного пола, развивается ОАО по механизму “эффекта

Таблица 1. Частота индуцированных ХА в неадаптированных и адаптированных женских лимфоцитах при совместном культивировании с адаптированными и неадаптированными мужскими лимфоцитами

Хромосомные аберрации	РУ неадаптированные ♀ (+♂ неадаптированные)		ПАО адаптированные ♀ (+♂ неадаптированные)		ОАО неадаптированные ♀ (+♂ адаптированные)	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Число анализированных клеток	572		570		548	
Аберрантных клеток	211	36.9 ± 2.0	172	30.2 ± 1.9*	154	28.1 ± 1.9*
Всего аберраций	240	42.0 ± 2.1	186	32.6 ± 2.0*	162	29.6 ± 2.0*
Дицентрики + центрические кольца	154	27.0 ± 1.9	120	21.1 ± 1.7*	109	19.9 ± 1.7*
Ацентрические фрагменты	84	14.7 ± 1.5	66	11.6 ± 1.3	53	9.7 ± 1.3*

* Достоверно отличается от аналогичного показателя для РУ ($p < 0.05$).

Таблица 2. Частота индуцированных ХА в неадаптированных и адаптированных мужских лимфоцитах при совместном культивировании с адаптированными и неадаптированными женскими лимфоцитами

Хромосомные аберрации	РУ неадаптированные ♂ (+♀ неадаптированные)		ПАО адаптированные ♂ (+♀ неадаптированные)		ОАО неадаптированные ♂ (+♀ адаптированные)	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Число анализированных клеток	428		451		429	
Аберрантных клеток	142	33.2 ± 2.3	130	28.8 ± 2.1	117	27.3 ± 2.2
Всего аберраций	164	38.3 ± 2.3	141	31.3 ± 2.2*	133	31.0 ± 2.2*
Дицентрики + центрические кольца	88	20.6 ± 2.0	77	17.1 ± 1.8	71	17.3 ± 1.8
Ацентрические фрагменты	74	17.3 ± 1.8	63	14.0 ± 1.6	59	13.8 ± 1.7

* Достоверно отличается от аналогичного показателя для РУ ($p < 0.05$).

свидетеля”, и уровень индуцированных в них ХА падает по сравнению с контролем (когда культура облучена только в дозе 100сГр) на 19.1 и 29.5 % в мужских и женских лимфоцитах соответственно. В женских клетках как ПАО, так и ОАО выражены сильнее, чем в мужских, и наблюдаются по всем типам ХА, тогда как в мужских оба ответа достоверны лишь по суммам всех аберраций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Радиационно-индуцированный “эффект свидетеля”, как правило, регистрируется по различным морфологическим изменениям в необлученных клетках, соседствующих с облученными: хромосомные аберрации [11], микроядра [12], сестринские хроматидные обмены [13], мутации [14], апоптоз [8]. В ряде работ адаптивный ответ был выявлен и по некоторым функциональным критериям: геномная нестабильность [15], опухолевая трансформация [16], изменение экспрессии генов [17]. Мы исследовали радиационно индуци-

рованный “эффект свидетеля” по такой функциональной характеристике клетки, как способность приобретать радиоустойчивость после предварительного облучения в малой дозе. Использование совместного культивирования лимфоцитов разнополых доноров позволило оценить как прямой, так и опосредованный (т.е. развивающийся по механизму “эффекта свидетеля”) адаптивный ответ женских и мужских клеток по критерию индуцированных ХА.

Известно, что среди людей существуют межиндивидуальные различия по способности развития адаптивного ответа. Они могут быть генетически детерминированы [18], зависеть от наличия у человека тех или иных соматических патологий [19], определяться степенью генотоксичности окружающей среды [20, 21]. Возможно, разная выраженность как ПАО, так и ОАО у женского и мужского доноров, обнаруженная в настоящей работе, обусловлена одной из этих причин.

На выраженность адаптивного ответа существенное влияние оказывают временные схемы воздействия в адаптирующей и повреждающей дозах. Так, в работе Shadley с соавторами [22] было показано, что при облучении нестимулированных лимфоцитов G_0 в малой дозе, а на стадии G_2 в повреждающей – частота хроматидных aberrаций была такой же, как без предварительного облучения лимфоцитов. В то же время радиационное воздействие в низкой дозе на G_1 лимфоциты приводило к развитию адаптивного ответа. По мнению авторов, для эффективной адаптации клеток с помощью облучения в малых дозах требуется митогенная стимуляция лимфоцитов. Не было обнаружено адаптивного ответа по тесту хромосомных aberrаций в лимфоцитах и при такой схеме воздействия, когда адаптирующая и повреждающая дозы приходились на стадию G_0 , т.е. до внесения в среду культивирования ФГА [23]. В работе Рябченко, как и в нашем исследовании, предварительное облучение лимфоцитов проводилось на стадии G_0 , тем не менее авторы наблюдали достоверный адаптивный ответ при облучении в повреждающей дозе лимфоцитов G_2 [20].

Результаты нашего эксперимента свидетельствуют о том, что и при использованной нами временной последовательности адаптирующей (в G_0) и повреждающей (в G_1) доз ионизирующей радиации может развиваться адаптивный ответ как прямой, так и по механизму “эффекта свидетеля”.

По результатам большинства исследователей наиболее выраженный в количественном отношении адаптивный ответ наблюдается при предоблучении лимфоцитов на стадии G_1 . Это было показано по тестам хроматидных разрывов [22], хромосомных aberrаций [20, 23]. Обнаруженный в настоящей работе адаптивный ответ (как ПАО, так и ОАО) количественно был не слишком велик (20–30%), хотя и достоверен. Поэтому в дальнейших исследованиях ОАО на смешанной культуре лимфоцитов разнополых доноров планируется изменить временную схему воздействия адаптирующей и повреждающей доз таким образом, чтобы первая приходилась на стимулированные лимфоциты G_1 .

Таким образом, полученные в работе предварительные результаты показывают принципиальную возможность использования совместной культуры разнополых доноров для изучения радиационно-индуцированного “эффекта свидетеля” с помощью теста адаптивного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябуха А.К., Резвая С.П. // Докл. АН СССР. 1970. Т. 191. № 1. С. 244–246.
2. Сафронова В.Г. // Журн. эксперим. биол. и мед. 1968. Т. 11. С. 52–55.
3. Bychkovskaya I.B., Ochinskaya G.K., Yudin A.L. // Arch. Protistenk. 1980. V. 123. P. 1–11.
4. Wu L.-J., Randers-Pehrson G., Xu A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 4959–4964.
5. Абелева Э.А., Бурныченко Г.М., Джимухадзе Н.Ф. // Генетика. 1974. Т. 10. № 10. С. 80–86.
6. Ondrej M. // Folia Biol. CSSR. 1971. V. 17. № 5. P. 229–303.
7. Фокина Т.Л., Воробцова И.Е. // Радиобиология. 1987. Т. 27. Вып. 2. С. 274–277.
8. Sawant S.G., Randers-Pehrson G., Geard C.R. et al. // Radiat. Res. 2001. V. 155. P. 397–401.
9. Watson G.E., Lorimore S.A., Macdonald D.A., Wright E.G. // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 5608–5611.
10. Mothersill C., Seymour C. // Int. J. Radiat. Biol. 1997. V. 71. 421–427.
11. Little J.B., Nagasawa H., Pfenning T., Vetrovs H. // Radiat. Res. 1997. V. 148. P. 299–307.
12. Prise K.M., Belyakov O.V., Folkard M., Michael B.D. // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74. P. 793–798.
13. Nagasawa H., Little J.B. // Cancer Res. 1992. V. 52. P. 6394–6396.
14. Zhou H., Randers-Pehrson G., Waldren C.A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 2099–2104.
15. Lorimore S.A., Wright E.G. // Int. J. Radiat. Biol. 2003. V. 79. № 1. P. 15–25.
16. Sigg M., Crompton N.E., Burkart W. // Radiat. Res. 1997. V. 148. P. 543–547.
17. Azzam E.I., de Todeo S.M., Gooding T., Little J.B. // Radiat. Res. 1998. V. 150. P. 497–504.
18. Lindahl T., Sedgwick B., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 57. P. 133–157.
19. Пелевина И.И., Алещенко А.В., Готлиб В.Я. и др. // Радиационная биология. Радиозэкология. 2005. Т. 45. № 4. С. 412–415.
20. Рябченко Н.И., Антошина М.М., Насонова В.А., Фесенко Э.В. // Радиационная биология. Радиозэкология. 1995. Т. 35. № 5. С. 670–675.
21. Пелевина И.И., Афанасьев Г.Г., Алещенко А.В. и др. // Радиационная биология. Радиозэкология. 1999. Т. 39. № 1. С. 106–112.
22. Shadley J.D., Afzal V., Wolff S. // Radiat. Res. 1987. V. 111. P. 511–517.
23. Wang Z.-Q., Saigusa S., Sasaki M.S. // Mutation Res. 1991. V. 246. P. 179–186.

Поступила в редакцию
06.06.2007 г.

Investigation of Radiation-Induced “Bystander Effect” Using Model of Adaptive Response in Mixed Lymphocyte Culture from Humans of Different Gender

I. E. Vorobtsova, I. S. Kolesnikova

*Federal State Institution the Central Research Institute of Roentgenology and Radiology of Federal Agency on Public Health and Social Development, Saint-Petersburg, 197758 Russia;
e-mail: radgen@sertolovo.ru*

The novel method for the investigation of radiation-induced “bystander effect” has been tested on the model of mixed lymphocyte culture from humans of different gender. The “bystander effect” was estimated by the ability of nonirradiated female/male cells to develop an adaptive response in mixed culture with irradiated at the dose 0.05 Gy of X-rays G_0 lymphocytes of opposite gender. The preliminary results indicate that both irradiated lymphocytes and non-irradiated but neighbouring with pre-exposed cells are less susceptible to the genetic damages manifested as chromosome aberrations induced in G_1 lymphocytes by a subsequent high dose of X-ray (1.0 Gy). Direct adaptive response as well as indirect one were expressed more obvious in female lymphocytes.