

УДК 576.316+575.113:616.15:614.876

О. В. Шеметун✉, О. О. Талан

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ МОДИФІКАЦІЇ ЕФЕКТУ СВІДКА, ІНДУКОВАНОГО РЕНТГЕНІВСЬКИМ ВИПРОМІНЮВАННЯМ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета: дослідити модифікацію радіаційно-індукованого ефекту свідка, спричиненого рентгенівським опроміненням периферичної крові людини *in vitro*, шляхом застосування антиоксидантного вітамінного препарату.

Матеріал дослідження: лімфоцити периферичної крові людини.

Методи: моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка *in vitro* в змішаних культурах лімфоцитів, опромінених в дозі 1 Гр, та неопромінених лімфоцитів крові осіб різної статі, GTG-забарвлення метафазних хромосом та їх цитогенетичний аналіз.

Результати: при введенні антиоксидантного препарату в змішану культуру перед культивуванням частота аберацій хромосом в клітинах-свідках статистично-достовірно не відрізнялась від контрольної ($p > 0,05$).

Висновки: використання антиоксидантного препарату (водорозчинні форми вітамінів E, C і A) в концентрації 40 мкг/мл модифікує радіаційно-індукований ефект свідка в неопромінених лімфоцитах периферичної крові людини при їх сумісному культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозі 1 Гр. Антиоксидант запобігає розвитку вторинного оксидативного стресу в неопромінених клітинах, нівелює розвиток в них радіаційно-індукованого ефекту свідка та забезпечує збереження стабільності їх хромосомного апарату.

Ключові слова: радіаційно-індукований ефект свідка, модифікація, антиоксидантний препарат, аберації хромосом, лімфоцити периферичної крові людини.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 371–376.

O. V. Shemetun✉, O. O. Talan

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Investigation of modification X-ray induced bystander effect *in vitro*

Objective – to investigate the modification of bystander effect induced by X-irradiation of human peripheral blood *in vitro* by application of antioxidant vitamin medication.

Material and methods. Modeling of radiation-induced bystander effect *in vitro* in mixed lymphocyte cultures exposed to dose of 1 Gy and non-irradiated blood lymphocytes of persons of different sexes, GTG-staining of metaphase chromosomes and their cytogenetic analysis; application of antioxidant preparation (soluble forms of vitamins E, C and A) in concentration 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Results. Under the introduction of antioxidant preparation into mixed culture before lymphocytes cultivation frequency of chromosomal aberrations in bystander cells did not significantly differ from the control ($p > 0.05$).

Conclusions: application of antioxidant preparation modifies the radiation-induced bystander effect in unirradiated human peripheral blood lymphocytes under their joint cultivation with lymphocytes irradiated in dose of 1 Gy. Antioxidant prevents the development of secondary oxidative stress in unirradiated cells, eliminates the development in them of radiation-induced bystander effect and ensures the preservation of stability of their chromosome apparatus.

Key words: radiation-induced bystander effect, modification, antioxidant vitamin preparation, chromosome aberrations, human peripheral blood lymphocytes.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:371-376.

✉ Шеметун Олена Володимирівна, e-mail: shemetun@ukr.net

ВСТУП

Дія іонізуючого випромінювання супроводжується вивільненням з пошкоджених радіацією клітин в оточуюче їх середовище цитокінів і факторів, що сприяють розвитку вторинного оксидативного стресу та індукції ефекту свідка в неопромінених клітинах [1]. В клітинах-свідках відмічено утворення вільних радикалів, активізацію експресії генів, індукцію мутацій, сестринських хроматидних обмінів, аберацій хромосом, мікроядер, бласттрансформацію [1–4]. У зв'язку із зазначеним актуальним є зменшення чи нівелювання розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка в опроміненному організмі шляхом нейтралізації вільних радикалів і призупинення реакцій перекисного окислення в тканинах, що буде сприяти профілактиці виникнення нестохастичних та стохастичних (включаючи розвиток вторинних пухлин після променевої терапії) ефектів радіаційного впливу в опромінених осіб.

До найвідоміших радіопротекторів природного походження відносяться вітаміни – токоферол, ретинол, каротиноїди, аскорбінова кислота. Вказані речовини є потужними антиоксидантами і в малих кількостях здатні зменшувати чи повністю припиняти ланцюгові реакції перекисного окислення білків, нуклеїнових кислот і ліпідів в тканинах, тобто захищати біологічну мішень від оксидативного стресу, який є провідною ланкою в механізмі розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка [5–7].

МЕТА

Метою роботи було дослідження модифікації радіаційно-індукованого ефекту свідка, спричиненого рентгенівським опроміненням лімфоцитів периферичної крові *in vitro*, шляхом застосування антиоксидантного вітамінного препарату.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові волонтерів (трьох чоловічої і трьох жіночої статі), які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенами.

Робота виконана за допомогою цитогенетичного методу аналізу з використанням розробленої нами модельної системи зі змішаної культури опромінених і неопромінених лімфоцитів периферичної крові донорів різної статі та застосуванням антиоксидантного препарату для модифікації радіаційно-індукованого ефекту свідка шляхом зменшення оксидативного пошкодження ДНК в неопромінених клітинах-свідках [8, 9].

INTRODUCTION

The action of ionizing radiation is accompanied by the release from irradiated cells into the surrounding medium cytokines and factors that promote the development of secondary oxidative stress and induction of bystander effect in unirradiated cells [1]. In bystander cells free radicals formation, activation of gene expression, induction of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, micronuclei, blasttransformation were observed [1–4]. Decrease or elimination of radiation-induced bystander effect in the irradiated human body by neutralization of free radicals and suspension of peroxidation reactions in tissues, which will help to prevent the emergence of non stochastic and stochastic (including the development of secondary tumors following radiotherapy) effects of radiation exposure in exposed individuals is relevant in connection with mentioned above.

The most famous naturally occurring radioprotectors include vitamins – tocopherol, retinol, carotenoids, ascorbic acid. These substances are powerful antioxidants and in small amounts can reduce or completely stop the chain reaction of lipid peroxidation of proteins, nucleic acids and lipids in tissues i.e. to protect the biological target from oxidative stress, which is the leading element in the mechanism of radiation-induced bystander effect [5–7].

OBJECTIVE

Objective of the study was the investigation of bystander effect modification induced by X-rays in peripheral blood lymphocytes *in vitro* by the application of antioxidant vitamin preparation.

MATERIALS AND METHODS

The research material was peripheral blood lymphocytes of volunteers (three male and three female) who denied conscious contact with ionizing radiation and other mutagens.

The study was performed by cytogenetic approach using a model system of mixed culture of irradiated and non-irradiated peripheral blood lymphocytes from donors of different gender for application of antioxidant medication to modify the radiation-induced bystander effect by reducing oxidative DNA damage in non-irradiated bystander cells [8, 9]. The model system was developed by authors.

Цільну кров опромінювали в дозі 1 Гр на установці РУМ-17. Антиоксидантний препарат, що містив водорозчинні форми токоферолу (40 мг/мл), аскорбінової кислоти (40 мг/мл) та ретинолу (20 мг/мл), вносили в змішані культури опромінених і неопромінених лімфоцитів перед їх культивуванням у концентрації 40 мкг/мл.

Препарати фарбували за допомогою GTG методу [10]. Аналіз проводили під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Реєстрували всі аберації хроматидного і хромосомного типів. Пошкоджені хромосоми та точки розривів ідентифікували згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-2013 [11]. При виконанні досліджень проаналізували 2184 клітин-свідків зі змішаних культур опромінених і неопромінених лімфоцитів.

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний аналіз показав, що рівень аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках, що культивувались сумісно з опроміненими в дозі 1 Гр лімфоцитами, становив $5,34 \pm 0,49$ на 100 метафаз і перевищував показники контрольних культур ($p < 0,001$) (рис. 1). Застосування антиоксидантного препарату перед сумісним культивуванням лімфоцитів спричинило зниження середньої частоти аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках

The whole blood was irradiated in dose of 1 Gy using the RUM-17 installation. Antioxidant medication containing water-soluble forms of tocoferol (40 mg/ml), ascorbic acid (40 mg/ml) and retinol (20 mg/ml), exposed to mixed lymphocytes' cultures before their culturing in concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$

GTG-banding metaphase chromosomes staining was used [10]. The analysis was carried out under the microscope with magnification $\times 1000$. All chromatid and chromosome types of aberrations were recorded. Damages of chromosomes and points of breaks were identified according to the international nomenclature ISCN-2013 [11]. In total 2184 G-stained bystander cells from mixed cultures of irradiated and non-irradiated lymphocytes were analyzed.

Obtained data were statistically evaluated by Student's-Fisher's method of mean values comparing [12].

RESULTS AND DISCUSSION

According to cytogenetic analysis the level of chromosome aberrations in non-irradiated bystander cells cocultured with lymphocytes irradiated in vitro in dose of 1.00 Gy was 5.34 ± 0.49 per 100 metaphases and exceeded that in control cultures ($p < 0.001$) (Fig. 1). Application of antioxidant medication before the mixed culturing of lymphocytes resulted in a decrease of average incidence of chromosome aberrations in non-irra-

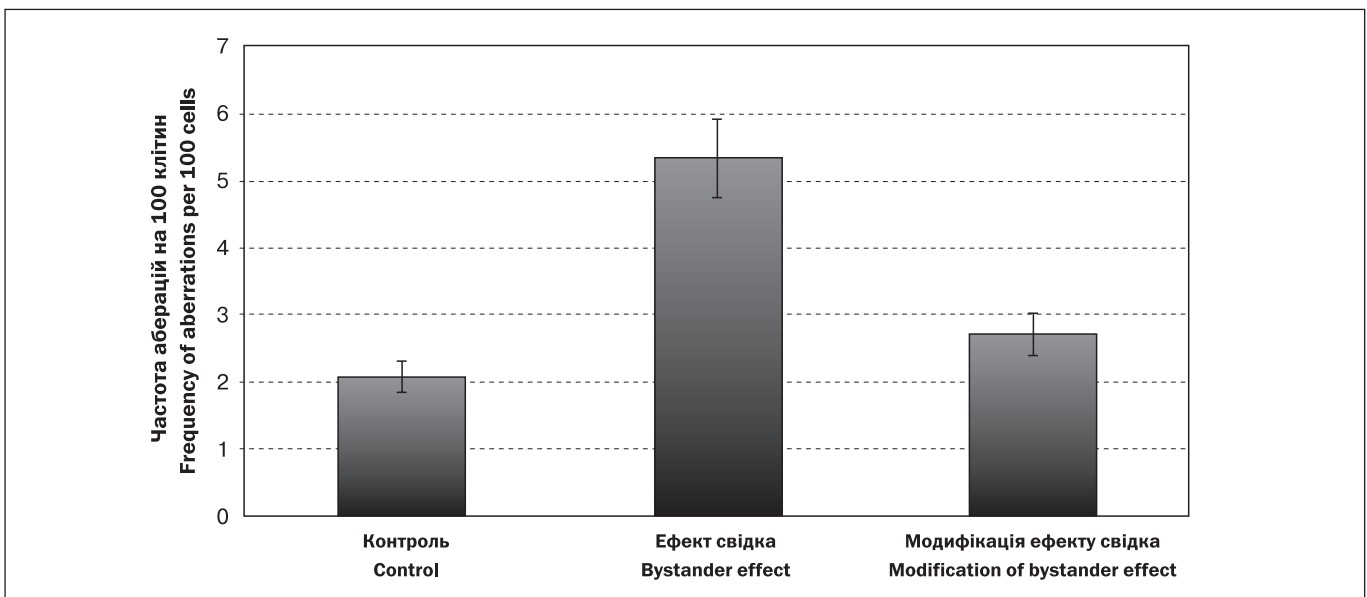


Рисунок 1. Частота аберацій хромосом у неопромінених клітинах-свідках та її модифікація з використанням антиоксидантного препарату

Figure 1. The frequency of chromosome aberrations in non-irradiated bystander cells and its modification with the help of antioxidant preparation

до рівня, що не відрізнявся від показників контролю ($p > 0,05$).

При розвитку ефекту свідка переважну більшість серед зареєстрованих пошкоджень хромосом становили хроматидні розриви, індукція яких притаманна для його реалізації на цитогенетичному рівні. Частота цих пошкоджень статистично достовірно перевищувала контрольну ($p < 0,001$), (табл. 1).

Модифікація ефекту свідка за допомогою антиоксидантного препарату знизила частоту хроматидних розривів до рівня, що не мав статистично значимої різниці з контролем ($p > 0,05$). Враховуючи, що в механізмі розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка ключова роль належить вторинному оксидативному стресу, отриманий результат став наслідком зниження інтенсивності процесів окислення-відновлення в неопромінених клітинах-свідках за рахунок антиоксидантних властивостей вітамінів, які входять до складу препарату.

Частота аберацій хромосомного типу (делецій, транслокацій, інверсій, дицентриків, кільцевих хромосом) в неопромінених клітинах-свідках не мала статистичної різниці з показниками контролю ($p > 0,05$), що вказує на відсутність індукції цих пошкоджень внаслідок ефекту свідка.

В спектрі аберацій хромосомного типу переважали термінальні делеції. Їх рівень в клітинах-свідках складав $0,90 \pm 0,21$ на 100 метафаз і статистично не відрізнявся від частоти цих пошкоджень в лімфоцитах, що культивувались з антиоксидантним препаратом ($p > 0,05$). Частота інтерстиціальних делецій хро-

diated bystander cells to the level in control cultures of non-irradiated lymphocytes ($p < 0.05$).

The development of bystander effect in the majority of chromosome damages was presented by chromatid breaks, which induction is inherent for its realization on the cytogenetic level. The frequency of these aberrations was significantly higher than the control values ($p < 0.001$) (Table 1).

The modification of bystander effect with the help of antioxidant medication reduced the chromatid breaks frequency to a level that was not significantly different from control ($p > 0.05$). Taking into account that secondary oxidative stress have a key role in the radiation-induced bystander effects mechanism, the received result is the consequence of reducing the intensity of redox processes in non-irradiated bystander cells due to the antioxidant properties of vitamins that are essential part of used medication.

The frequency of chromosome types aberrations (deletions, translocations, inversions, dicentric and ring chromosomes in bystander cells did not have the statistical difference with the control parameters ($p > 0.05$), indicating lack of induction these damages by bystander effect.

The terminal deletions dominated in the spectrum of chromosome type aberrations. Their level in bystander cells was 0.90 ± 0.21 per 100 metaphases and did not statistically differ from the frequency of these damages in lymphocytes that were cultured with antioxidant medication ($p > 0.05$). The fre-

Таблиця 1

Цитогенетичні показники, зареєстровані при модифікації антиоксидантним препаратом радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах периферичної крові людини

Table 1

Modification of radiation-induced bystander effect in human peripheral blood lymphocytes by antioxidant medication recorded as cytogenetic parameters

Вид аберацій Type of aberrations	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин Frequency of chromosome aberrations per 100 cells		
	Контроль Control	Ефект свідка Bystander effect	Модифікація ефекту свідка Modification of bystander effect
Хроматидні розриви / chromatid breaks	$0,87 \pm 0,22$	$3,97 \pm 0,42^*$	$1,14 \pm 0,23$
Делеції термінальні / terminal deletions	$0,65 \pm 0,19$	$0,90 \pm 0,21$	$0,92 \pm 0,20$
Делеції інтерстиціальні / interstitial deletions	$0,16 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,09$
Дицентрики / dicentric chromosomes	$0,05 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,06$
Кільцеві хромосоми / ring chromosomes	$0,05 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Транслокації / translocations	$0,27 \pm 0,12$	$0,24 \pm 0,11$	$0,27 \pm 0,11$
Інверсії / inversions	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,06$

Примітка. * – статистично достовірна різниця $p < 0,001$.
Note. * – statistically significant difference $p < 0.001$.

мосом також статистично не розрізнялась у всіх варіантах досліду ($p > 0,05$).

Рівень асиметричних хромосомних обмінів (дичентричних та кільцевих хромосом) в неопромінених клітинах-свідках не мав істотної різниці з показниками контрольних культур та з результатами досліду при застосуванні антиоксиданту ($p > 0,05$).

Частота симетричних хромосомних обмінів (транслокацій) у клітинах-свідках становила $0,24 \pm 0,11$ на 100 метафаз, і статистично не відрізнялась від показників в контрольних культурах та результатів, отриманих при дії антиоксидантного препарату.

Аналіз індивідуальних рівнів аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках показав, що в усіх обстежених осіб та в усіх поставлених культурах було зареєстровано ефект свідка. Частоти аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках знаходились в межах від 4,23 до 6,67 на 100 клітин, і статистично достовірно перевищували показники контрольних культур неопромінених лімфоцитів ($p < 0,05$).

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

ВИСНОВКИ

Застосування антиоксидантного вітамінного препарату у концентрації 40 мкг/мл перед сумісним культивуванням неопромінених та опромінених в дозі 1,0 Гр лімфоцитів крові людини дозволяє модифікувати радіаційно-індукований ефект свідка та знизити середню частоту аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках до рівня, що статистично-достовірно не відрізняється від контрольного ($p > 0,05$). Отримані дані свідчать про захист антиоксидантним препаратом неопромінених клітин від розвитку в них вторинного оксидативного стресу, нівелювання розвитку в них радіаційно-індукованого ефекту свідка, що забезпечує збереження стабільності їх хромосомного апарату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wright E. Mechanisms of non-targeted effects (14 June 2010) [Electronic resource]. – Available from : https://www.note-ip.org/Meetings_and_events/NOTE_Workshops.
2. Mothersill C. Characterisation of a bystander effect induced in human tissue explant cultures by low let radiation / C. Mothersill, K. O'Malley, C. Seymour // Radiat. Prot. Dosimetry. – 2002. – Vol. 99, № 1-4. – P. 163–167.

quency of interstitial deletions also did not differ statistically in all variants of the experiment ($p > 0.05$).

The level of asymmetric chromosome exchanges (dicentric and ring chromosomes) in non-irradiated bystander cells had not significant difference from control cultures indices and the results of the experiment with the usage of antioxidant ($p > 0.05$).

Frequency of symmetric chromosomal exchanges (translocations) in bystander cells was 0.24 ± 0.11 per 100 metaphases being not statistically different from those in control cultures and the results obtained by the effect of antioxidant medication.

Analysis of individual levels of chromosome aberrations in non-irradiated bystander cells showed that the bystander effect was registered all volunteers and in all tested cultures. The frequencies of chromosomal aberrations in non-irradiated bystander cells were in the range of 4.23 to 6.67 per 100 cells significantly exceeding the parameters in control cultures of non-irradiated lymphocytes ($p < 0.05$).

Thus the application of antioxidant medication promoted the reduction of individual levels of chromosome aberrations in non-irradiated bystander cells to the levels, that did not have significant difference from control ($p > 0.05$) and were in the range of 1.37 to 4.25 per 100 cells.

CONCLUSIONS

Application of antioxidant vitamin medication in concentration 40 $\mu\text{g/ml}$ before joint cultivation of human blood lymphocytes non-irradiated and irradiated in dose of 1.0 Gy allows to modify the radiation-induced bystander effect and to reduce the frequency of chromosome aberrations in non-irradiated bystander cells to the level that has not significant difference from the control ($p > 0.05$). These data testify about the protection of non-irradiated cells by antioxidant medication from the occurrence of secondary oxidative stress, elimination the development of radiation-induced bystander effect and preservation of chromosome stability.

REFERENCES

1. Wright E. Mechanisms of non-targeted effects (14 June 2010) [Internet]. Available from : https://www.note-ip.org/Meetings_and_events/NOTE_Workshops.
2. Mothersill C, O'Malley K, Seymour C. Characterisation of a bystander effect induced in human tissue explant cultures by low let radiation. Radiat Prot Dosimetry. 2002;99(1-4):163-7.

3. Wright E. G. Commentary on radiation-induced bystander effects / E. G. Wright // Human and Experimental Toxicology. – 2004. – Vol. 23, No. 2. – P. 91–94.
4. Литтл Д. Б. Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям / Д. Б. Литтл // Радиация, биология, радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 262–272.
5. Клебанов Г. И. Антиоксиданты. Антиоксидантная активность. Методы исследования (2010) [Электронный ресурс] / Г. И. Клебанов. – Режим доступа : <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1289>.
6. Полосьянец О. Б. Витамины-антиоксиданты в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний [Электронный ресурс] / О. Б. Полосьянец, Л. А. Алексанян // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 11. – С. 780–786. – Режим доступа : http://www.rmj.ru/articles_3761.htm.
7. Конопаска М. The influence of antioxidant vitamins on the radiation-induced bystander effect in normal human lymphocytes / М. Конопаска // Сучасні проблеми радіаційних досліджень : 35-а щорічна конференція Європейського товариства з радіаційних досліджень : зб. матеріалів. – К. : [б. в.], 2007. – С. 94–101.
8. Шеметун О. В. Модель для дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка з використанням лімфоцитів периферичної крові людини / О. В. Шеметун, О. О.Талан, М. А. Пілінська // Журн. АМН України. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 556–565.
9. Методика цитогенетичного дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка: інформаційний лист / Науковий центр радіаційної медицини АМН України. – К. : [б. в.], 2007. – 4 с.
10. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації / КМАПО МОЗ України. – К. [б. в.], 2003. – 23 с.
11. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel : Karger, 2013. – 140 p.
12. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии. – Горловка : Лихтар, 2008. – 248 с.
3. Wright EG. Commentary on radiation-induced bystander effects. Hum Exp Toxicol. 2004 Feb;23(2):91-4.
4. Little DB. [Untarget effects of ionizing radiation: conclusions applied to low-dose effects]. Radiats Biol Radioecol. 2007;47(3):262-72. Russian.
5. Klebanov GI. Antioxidants. The antioxidant activity. Methods of investigation (2010) [Internet]. Available from : <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1289>. Russian.
6. Polosyants OB, Aleksanyan LA. Antioxidant vitamins in the prevention and treatment of cardiovascular diseases [Internet]. Russkii meditsinskii zhurnal. 2005;13(11):780-6. Available from : http://www.rmj.ru/articles_3761.htm. Russian.
7. Konopaska M. The influence of antioxidant vitamins on the radiation-induced bystander effect in normal human lymphocytes. Suchasni problem radiatsiinykh doslidzhen. 35-a shchorichna konferentsiia Yevropeis'koho tovarystva z radiatsiinykh doslidzhen: zbirnyk materialiv. Kyiv: [s. n.]; 2007. p. 94-101.
8. Shemetun O, Talan O, Pilinska M. [Model for detection of radioinduced "bystander effect" with the help of human peripheral blood lymphocytes]. Zhurnal Akademii Medychnykh Nauk Ukrainy. 2006;12(3):556-65. Ukrainian.
9. National Research Center for Radiation Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine. [Method of cytogenetic studies of radiation-induced bystander effect: information letter]. Kyiv: [s. n.]; 2007. 4 p. Ukrainian.
10. Kyivska medychna akademiia pisladyplomnoi osvity Ministry of Health of Ukraine. [Cytogenetic methods of investigation of human chromosomes: methodic recommendations]. Kyiv: [s. n.]; 2003. 23 p. Ukrainian.
11. Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013). Basel: Karger; 2013. 140 p.
12. Atramentova LA Utevskaia AM. [Statistical methods in biology]. Horlovka: Likhtar; 2008. 248 p. Russian.

Стаття надійшла до редакції 22.07.2014

Received: 22.07.2014