

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЭФФЕКТА
«СВИДЕТЕЛЯ»**

**О.П. Василенко, С.Р. Рушковский, С.В. Демидов,
А.В. Александров, Г.С. Демидова**

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка

Введение

До недавнего времени для объяснения повреждающего действия мутагенов различной природы использовалась классическая теория мишени, разработанная сначала для описания эффектов ионизирующей радиации, а впоследствии перенесенная и на другие повреждающие геном факторы. В соответствии с этой теорией, изменения генома являются результатом непосредственного взаимодействия мутагенного фактора с мишенью (ядро), что приводит к образованию разнообразных повреждений ДНК и, как следствие, мутаций [1]. Однако, еще с 70-х годов прошлого века стали появляться данные, согласно которым мутагенный эффект может наблюдаться в клетках не только находящихся в зоне действия мутагенного фактора (например, ионизирующего излучения), а также на достаточной дистанции от области «мутагенного поражения» [2].

Активно проблему дистанционного влияния мутагенных факторов стали изучать после опубликования 1992 году работы Х. Нагасавы и Дж. Литгла [3], где подобный эффект описывался при облучении монослойной культуры клеток яичников китайского хомячка сверхмалыми дозами α -излучения. В последствии данное явление было зафиксировано и при отсутствии физического контакта между облученными и не облученными клетками в суспензионной культуре [4], а также при облучении цитоплазмы клеток без непосредственного воздействия на ядро [5]. Феномен, при котором повреждаются клетки, находящиеся вне зоны непосредственного влияния ионизирующего излучения, но каким-либо образом контактирующие с облученными клетками, получил название радиационно-индуцированного эффекта «свидетеля» (ЭС) [6]. Поскольку ЭС обычно проявляется при очень низких дозах ионизирующего излучения он вызвал интерес как с теоретической точки зрения (смещение парадигмы радиобиологии

в сторону немишенных эффектов и координации тканевого ответа на радиационное повреждение) [7], так и прикладных аспектов онкологии (механизмы канцерогенного действия малых доз ионизирующего излучения) и радиационной медицины (в свете отдаленных генетических последствий радиационной терапии) [8].

Большинство работ по изучению эффекта «свидетеля» проводится на клетках млекопитающих, однако, ЭС был зарегистрирован во многих экспериментах на клетках позвоночных и других многоклеточных [9], а также некоторых представителей одноклеточных организмов [10]. Это говорит о универсальности эффекта «свидетеля» для разных, эволюционно далёких видов. Кроме того, в последнее время ЭС стали детектировать не только при облучении клеток ионизирующим излучением, но и при воздействии на них ультрафиолетовыми лучами [11], высокими температурами [12] и химическими агентами [13].

Несмотря на активный интерес исследователей к феномену ЭС, механизмы повреждения генома в клетках-свидетелях пока что остаются не до конца исследованными. В представленной работе мы собрали данные о генетических проявлениях ЭС, возможной природе повреждающих ЭС-сигналов, а также о перспективных подходах к регистрации и изучению механизмов ЭС.

Генетические проявления эффекта «свидетеля»

Одними из значимых последствий контакта необлученных клеток с облученными является дестабилизация генома клеток-свидетелей. Она регистрируется по увеличению уровня поврежденности ДНК, количества микроядер, генных мутаций и хромосомных aberrаций [14].

Среди всех повреждений структуры ДНК, двухцепочечные разрывы считаются одними из самых опасных для клетки, поскольку, с одной стороны, являются причиной хромосомной нестабильности, а с другой, могут привести к ее гибели. При облучении α -частицами или γ -лучами, повышение уровня двунитевых разрывов регистрируют как в облученных клетках, так и в клетках-свидетелях. Однако, если в облученных клетках двухцепочечные разрывы начинают формироваться почти сразу после воздействия на них ионизирующего излучения, то в клетках-свидетелях они возникают только через несколько часов после облучения и с гораздо меньшей частотой [15].

Увеличение уровня микроядер очень часто используют как маркер формирования ЭС в клетках-свидетелях не только при

воздействии ионизирующим излучением, но и при температурном шоке [12] или повреждении клеток химическими агентами (например митомицином С или флеомицином) [13]. Образование хромосомных aberrаций также было показано при воздействии факторов разной физической природы (ионизирующее излучение и ультрафиолетовые лучи) [11]. Для облученных ионизирующим излучением клеток характерны aberrации хромосомного типа (дицентрические хромосомы, двойные фрагменты, ацентрические кольца), тогда как у клеток-свидетелей преобладают aberrации хроматидного типа (хроматидные фрагменты) [16].

Поскольку динамика и частота генетических повреждений в облученных клетках и клетках-свидетелях отличается, то можно сделать вывод, что механизмы образования подобных нарушений разные [6]. В клетках-свидетелях показана индукция образования мутагенных веществ (например, реактивных форм кислорода), а также эпигенетические изменения генома, которые влияют на эффективность репарации эндогенных повреждений ДНК или приводят к нарушениям чек-поинтов клеточного цикла [17, 18].

Кроме геномных нарушений наблюдаются и другие эффекты, индуцируемые в клетках-свидетелях. Так, было показано значительное изменение уровня экспрессии генов p53, p21, MDM2, CDC2, RAD51, циклина В1 в клетках-свидетелях и повышение экспрессии интерлейкина-1 α и β -интегрина [16], что в конечном итоге может приводить к различным проявлениям ЭС на клеточном уровне, таким как: потеря пролиферативного потенциала, ингибирование роста, индукция терминальной дифференциации клеток или, наоборот, увеличение их злокачественности, индукция апоптоза [14]. Ранние этапы апоптотических каскадных реакций при ЭС ответе могут также индуцироваться в результате увеличения уровня внутриклеточного кальция, реактивных форм кислорода и утраты митохондриального мембранного потенциала [18].

Современные представления о природе ЭС сигнала

Наиболее дискуссионным вопросом при рассмотрении механизмов запуска эффекта «свидетеля» является природа повреждающего клетку-соседа фактора, который выделяется облученной клеткой. Предполагают, что факторы принимающие участие в формировании ЭС существуют в виде белковых молекул и/или реактивных форм кислорода (РФК) [7].

ЭС фактор который синтезируется под воздействием радиационного излучения, и выделяется в питательную среду, может сам по себе вызывать эффект «свидетеля» или может стимулировать внеклеточный синтез реактивных форм кислорода (РФК), которые и вызывают эффект «свидетеля» [14]. Передача этих сигналов происходит путём синтеза в питательную среду или прямой передачи через щелевидные межклеточные контакты [16]. Среди сигнальных молекул белковой природы можно выделить такие основные факторы, возможно принимающие участие в передаче ЭС сигнала как трансформирующий фактор-бета (TGF- β 1), интерлейкин-8, циклооксигеназа-2. Также в облучённых клетках замечено увеличение уровня экспрессии p53, ингибиторов циклин-зависимых киназ p21CIP1/WAF1, лигандов CD95 (APO-1/Fas), каспазы-8, CDKN1A, RAD51 [6].

Также показано, что в формировании эффекта «свидетеля» принимают важное участие реактивные формы кислорода, такие как супероксид анион и перекись водорода. Однако снижение индукции ЭС под влиянием разных антиоксидантов было замечено не всегда. Это можно объяснить тем, что РФК, возможно, играют не самую важную роль в формировании ЭС, и их уровень зависит от многих других факторов [4]. Одним из таких факторов может выступать монооксид азота (NO). Повышение уровня NO индуцирует в клетках оксидативный стресс, стимулирование пролиферации и увеличение уровня микроядер в клетках-свидетелях [19].

Другими возможными факторами, которые могут принимать участие в формировании ЭС могут быть молекулы нуклеиновых кислот. Ряд экспериментов показал, что выделяемые при индуцированном ионизирующим излучением апоптозе фрагменты ДНК могут рассматриваться как сигнальные молекулы [20]. Некоторыми авторами как ЭС сигнальные молекулы также рассматриваются микроРНК, однако эти молекулы, скорее всего, принимают участие в формировании ответа на стрессовые факторы в клетке-свидетеле, тогда как их роль в качестве сигнальной молекулы пока что не доказана [21].

Таким образом, вопрос о повреждающих клетки-свидетели факторах при индукции эффекта «свидетеля» остается открытым. Это может быть какой-либо один универсальный фактор, который выделяют все клетки, подвергшиеся влиянию мутагенного фактора, или целый комплекс сигнальных молекул, который вызывает схожие неспецифические изменения в клетках-свидетелях.

Современные подходы к регистрации и изучению эффекта «свидетеля»

Главной задачей при изучении ЭС является необходимость отделить облучённые клетки от необлучённых клеток-свидетелей, в которых и наблюдают ЭС. На данный момент для изучения механизмов, последствий и особенностей ЭС разработаны такие основные методики, как облучение отдельных клеток микропучковым ионизирующим излучением, перенос необлучённых клеток в питательную среду, в которой перед этим культивировали облучённые клетки и совместное культивирование облучённых и не облучённых клеток [16].

Использование микропучкового излучателя, который генерирует очень тонкий поток ионизирующих частичек, позволило облучать отдельные клетки или даже части клеток в монослойной культуре, а также чётко регулировать дозу ионизирующего излучения [5]. С помощью этого метода можно определить как далеко распространяется ЭС сигнал от облучённой клетки к интактным через щелевые контакты между ними. Эксперименты по переносу необлучённых клеток в питательную среду, в которой перед этим проводили культивирование облучённых клеток, показали, что среда, в которой облучались клетки, содержит вещества способные индуцировать ЭС в необлучённых клетках и для его проявления непосредственный межклеточный контакт не обязателен [17]. Питательные среды, облучённые в отсутствие клеток, мутагенными свойствами не обладают [14]. Таким образом, химический анализ сред, в которых культивируются обработанные мутагенами клетки, позволяет определить, какие факторы секретирует повреждённая клетка и какие из них могут влиять на индукцию ЭС.

Совместное культивирование позволяет изучать проявление ЭС между клетками с различными генотипами, разных цитологических типов, клетками неродственных видов и даже отдалённых систематических групп. Например, методика совместного культивирования лимфоцитов, полученных от мужчин и женщин, позволяет не только чётко различать клетки-свидетели от облучённых, но и даёт возможность изучать индивидуальные особенности проявления ЭС [22]).

Разработанная нами методика совместного культивирования лимфоцитов человека облучёнными дрожжами позволила установить, что одноклеточные организмы способны вызывать эффект «свидетеля» в клетках многоклеточных организмов. Причём сила

проявления эффекта «свидетеля» зависит от нормального функционирования митохондрий клеток-доноров ЭС сигнала. Это наводит на мысль об универсальности стрессорного сигнала, генерация которого напрямую связана с нормальным состоянием митохондрий и митохондриального генома. Возможность передачи ЭС сигнала между клетками организмов далеких друг от друга в эволюционном плане позволяет рассматривать значимость ЭС также и с эволюционной точки зрения, поскольку может гипотетически приводить к повышению уровня мутабельности особей не подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации, но каким-либо образом контактирующих с облученными организмами [23].

Выводы

1. Одним из значимых проявлений эффекта «свидетеля» является увеличение нестабильности генома клеток-свидетелей, что обусловлено как увеличением образования эндогенных мутагенов так и эпигенетическими изменениями генома.
2. Повреждения генома в облученных клетках и клетках-свидетелях схожи, однако природа их образования разная.
3. Проявления эффекта «свидетеля» на клеточном уровне связано с изменением экспрессии в клетках-свидетелях ключевых генов, отвечающих за пролиферацию, дифференциацию и апоптоз.
4. Вопрос о повреждающих клетки-свидетели мутагенных факторах при индукции эффекта «свидетеля» остается открытым.
5. Современные подходы к регистрации и изучению эффекта «свидетеля» позволяют получать разнообразную информацию о механизмах, последствиях и особенностях ЭС.

Литература

1. Гродзинський Д.М. Радіобіологія: підручник / Д.М. Гродзинський. – Київ: Либідь, 2000. – 448 с.
2. Кузин А. М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы / А. М. Кузин. – М.: Атомиздат, 1977. – 133 с.
3. Nagasawa H. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles / H. Nagasawa, J. Little // *Cancer Res.* – 1992. – Vol. 52, № 22. – P. 6394-6396.
4. Genotoxicity in the eyes of bystander cells / T. Hei, R. Persaud, H. Zhou, M. Suzuki // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 568, № 1. – P. 111-120.
5. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses / C. Shao, M. Folkard, B. Michael, K. Prise // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 37. – P. 13495-13500.

6. Little J. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective / J. Little // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, № 45. – P. 6978-6987.

7. Mathersill C. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an “out of field” perspective / C. Mathersill, C. Seymour // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 597, № 1-2. – P. 5-10.

8. Bystander responses in low dose irradiated cells treated with plasma from gamma irradiated blood / A. Acheva, R. Georgieva, I. Rupova [e.a.] // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2008. – P. 101.

9. Injection of reserpine into zebrafish, prevents fish to fish communication of radiation-induced bystander signals: confirmation in vivo of a role for serotonin in the mechanism / R. Sroya, R. Smith, C. Seymour, C. Mothersill // *Dose-Response* – 2010. – Vol. 8. – P. 317-330.

10. Василенко О.П. Хромосомная нестабильность в лимфоцитах периферической крови человека при совместном культивировании с облученными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / О.П. Василенко, О.В. Пронина, С.Р. Рушковський // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць. – Київ: Логос, 2011. – Т. 10. – С. 28-33

11. Василенко О. Порівняння ефективності індукції ефекту «свідка» при дії рентгенівського та ультрафіолетового опромінення / О.П. Василенко, О.В. Пронина, С. Р. Рушковський // *Мат. 5-го Укр. Біофіз. Тов.* – Луцьк, 2011. – С. 32.

12. Purschke M. Thermal injury causes DNA damage and lethality in unheated surrounding cells: active thermal bystander effect / M. Purschke, H. Laubach, R. Anderson, D. Manstein // *Journ. Of Inv. Dermat.* – 2010. – Vol. 130. – P. 86-92.

13. Asur R. Chemical induction of bystander effect in normal human lymphoblastoid cells / R. Asur, R. Thomas, J. Tucker // *Mut. Res.* – 2009. – Vol. 676, № 1-2. – P. 11-16.

14. Hall E. The bystander effect / E. Hall // *Health Physics.* – 2003. – Vol. 85, № 1. – P. 31-35.

15. Rzeszowska-Wolny J. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy / J. Rzeszowska-Wolny, W. Przybyszewski, M. Widel // *Europ. Journ. of Pharmacol.* – 2009. – Vol. 625. – P. 156-164.

16. Bystander-mediated genomic instability after high LET radiation in murine primary haemopoietic stem cells / D. Bowler, S. Moore, D. Macdonald [e.a.] // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 597, № 1-2. – P. 50-61.

17. Detection of chromosomal instability in α -irradiated and bystander human fibroblasts / B. Ponniaya, G. Jenkins-Baker, A. Bigelow, [e.a.] // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 568, № 1. – P. 41-48.

18. Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation / G. Watson, S. Lorimore, D. Macdonald, E. Wright // *Cancer. Res.* – 2000. – Vol. 60, № 20. – P. 5608-5611.

19. *Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses* / H. Matsumoto, N. Hamada, A. Takahashi // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. – 2007. – Vol. 48, № 2. – P. 97-106.

20. Ermakov A. *An extracellular DNA mediated bystander effect produced from low dose irradiated endothelial cells* / A. Ermakov, M. Konkova, S. Kostyuk [e.a.] // *Mut. Res.* – 2011. – Vol. 712, № 1-2. – P. 1-10.

21. *H2AX phosphorylation in response to DNA double-strand break formation during bystander signalling: effect of microRNA knockdown* / J. Dickey, F. Zemp, A. Altamirano [e.a.] // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2011. – Vol. 143, № 2-4. – P. 264-269.

22. Shemetun O.V. *Modeling Radiation-induced bystander effect in a culture of human peripheral blood lymphocytes* / O.V. Shemetun, M.A. Pilins'ka // *Genetich. Posled. Chrezvych. Radiats. Situatsii (Genetic Consequences of Radiation Accidents), Proc. Third Intern. Conf. (Dubna, October 4-7, 2005)*. – Moscow, 2005. – P. 136-138.

23. Vasylenko O.P. *Bystander effect in human lymphocytes incubated with irradiated mitochondrial DNA deficient yeast cells* / O.P. Vasylenko, O.V. Pronina, S.R. Rushkovsky // *Radioprot.* – 2012. – Vol. 46, № 6. – P. 555.

Резюме

Василенко О.П., Рушковский С.Р., Демидов С.В., Александров А.В., Демидова Г.С. *Генетические последствия эффекта «свидетеля».*

В представленной работе мы собрали данные о генетических проявлениях и возможной природе повреждающих сигналов эффекта «свидетеля», а также о перспективных подходах к регистрации и изучению его механизмов.

Ключевые слова: эффект «свидетеля», ионизирующее излучение, хромосомные aberrации.

Резюме

Василенко О.П., Рушковський С.Р., Демидов С.В., Александров А.В., Демидова Г.С. *Генетичні наслідки ефекту «свідка».*

В представленій роботі ми зібрали дані про генетичні прояви та можливу природу пошкоджуючих сигналів ефекту «свідка», а також про перспективні підходи до реєстрації та вивчення його механізмів.

Ключові слова: ефект «свідка», іонізуюче випромінювання, хромосомні aberrації.

Summary

Vasylenko O.P., Rushkovsky S.R., Demydov S.V., Aleksandrov A.V., Demydova G.S. *Genetic endpoints of bystander effect.*

In present study, we collected data on the genetic aspects and the possible nature of the damaging bystander signals, and promising approaches for detection and study of its mechanisms.

Key words: bystander effect, ionizing radiation, chromosomal aberration.

Рецензент: д.біол.н., проф. В.К. Рибальченко

УДК 616.831-005.1/.6:548.33

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ FokI ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D З ФАКТОРАМИ РИЗИКУ ГОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМУ

В.Ю. Гарбузова

*Наукова лабораторія молекулярно-генетичних досліджень
Сумський державний університет*

Вступ

Серед чинників, з якими пов'язують розвиток ускладнень артеріосклерозу, в тому числі й гострого коронарного синдрому, важливого значення надають кальцифікації артерій. Відкладання солей кальцію в структурах артерій, на думку багатьох авторів, є несприятливим прогностичним фактором, що свідчить про високу ймовірність настання фатальних ускладнень [1, 2]. З огляду на це зусилля багатьох учених спрямовані сьогодні на розкриття механізмів, що лежать в основі кальцифікації кровоносних судин. Однією з центральних ланок у захисті судин від ектопічної кальцифікації виявився матриксний Gla-протеїн (MGP), наявність якого в тканинах перешкоджає як ініціюванню патологічного обвапнення, так і його поширенню [3, 4, 5, 6]. Важливе значення в експресії гена MGP має вітамін D, дія якого реалізується через рецептор вітаміну D (VDR). Враховуючи вище сказане, постає питання про можливу роль VDR у патогенезі судинних уражень та їх тяжких наслідків, таких як інфаркт міокарда. Один з підходів до розв'язання цієї проблеми полягає в дослідженні зв'язку поліморфізму гена VDR з розвитком серцево-судинних хвороб. На сьогодні таких робіт небагато, і в них вивчалася асоціація одонуклеотидних поліморфізмів VDR з ішемічною хворобою серця [7, 8], кальцифікуючим стенозом аортального клапана [9]. Що стосується зв'язку FokI поліморфізму з гострим коронарним синдромом, то такі дані взагалі відсутні, що й спонукало нас до проведення власних досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Визначення ролі поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку склеротичних уражень кровоносних судин» (№ 91.01.01.11-12).