

Д.Ж. Асаубаева^{1,2}, Н.Б. Ахматуллина², О.Г. Чердниченко²
**ИНДУКЦИЯ ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ**

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Институт общей генетики и цитологии
МОН РК)

Показано, что добавление облученной плазмы крови к необлученным лимфоцитам приводит к увеличению числа структурных aberrаций у последних; индукция эффекта свидетеля связана с выработкой предоблученными клетками некоего фактора, который выделяется в плазму, а не передается при прямом контакте между клетками; фактор стресс-сигнализации облученных клеток обнаруживает взаимосвязь/взаимобусловленность адаптивного ответа и эффекта свидетеля.

При изучении закономерностей и механизмов мутационного процесса в последние годы особое внимание уделяется вопросам его модификации факторами различной природы. Это связано как с ухудшающимся состоянием окружающей среды, так и с недостаточной изученностью механизмов специфических ответных реакций живых организмов на стрессовые воздействия (SOS-ответ, ответ теплового шока, оксидативный ответ, адаптивный ответ и т.д.).

Экспериментальные исследования факторов и условий снижения негативных эффектов генотоксических агентов среды весьма важны для решения задачи защиты и повышения устойчивости генетического материала. Причем, актуальность этой проблемы связана не только с ее практическим потенциалом, но и возможностью изучения общих механизмов мутагенеза.

Проблемы модификации мутагенеза и, в частности, изучение различных адаптивных реакций, являются сейчас предметом широких исследований во всем мире и представляются чрезвычайно актуальными для Казахстана, на территории которого имеется большое количество загрязненных, в том числе, радиоконтаминированных регионов.

Действие радиации, особенно ионизирующей, на клетку традиционно относили к повреждению ДНК с последующим нарушением различных ее функций, вплоть до гибели. Однако оказалось, что разрушительное действие радиации зависит от интенсивности действующих доз. Долгое время такую зависимость связывали лишь с уровнем проявления единичных изменений ДНК, а для понимания разнообразия их выражения, считалась достаточной простая экстраполяция от одних эффектов на другие. Но постепенно накапливалось множество доказательств о новых свойствах малых доз, не укладывающихся в ожидаемые от больших. Далее зависимость генетических эффектов ионизирующих радиаций от дозы превратилась в общую закономерность их действия, где малые дозы обрели особый статус. Становилось очевидным, что многообразие биологических реакций, вызываемое малыми дозами радиации, должно иметь в своей основе, более сложный механизм действия, отличный от установленного для высоких доз.

Снижение выхода генетических повреждений в результате реализации реакции адаптивного ответа в настоящее время склонны объяснять функционированием репаративных систем клетки, наличием пула клеток, обладающих повышенной устойчивостью к действию мутагенных факторов, вариациями в кинетике клеточного цикла [1].

При этом индуцированные радиацией события могут наблюдаться как в облученных, так и в соседних клетках, избежавших попадания ионизирующих частиц. Это явление – показанное и для агентов другой природы – получило в литературе название “*bystander*”-эффекта (эффект “свидетеля”).

Эффект «свидетеля» — поражение клеток, находящихся вне зоны действия радиации, но контактирующих (любым образом) с облучаемыми клетками. При этом имеется в виду как непосредственный контакт облученных и необлученных клеток, так и их нахождение в одном и том же культуральном сосуде, а в ряде случаев — и контакт необлученных клеток со средой, в которой другие клетки подвергались облучению.

Материалы и методы

Образцы периферической крови от здоровых доноров отбирали в стерильных условиях из локтевой вены в объеме 5 мл в гепаринизированные флаконы.

Для накопления метафазных пластинок в культуральную среду за 2 часа до фиксации вводили колхицин в конечной концентрации 0,8 мкг/мл.

Для получения цитологических препаратов клетки гипотонизировали 0,075М KCl при 37°С 15 минут, фиксировали смесью метиловый спирт/ледяная уксусная кислота (3/1) и окрашивали 4% раствором красителя Романовского-Гимза [2].

При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с aberrациями, а также число и тип aberrаций на 100 проанализированных метафаз. Полученные данные обрабатывались статистически [3].

Облучение. Цельную кровь в стеклянных флаконах облучали на линейном электронном ускорителе ЭЛУ-2 с номинальной энергией ускоренных электронов 2 МэВ с мощностью доз 0,01 Гр – 50 сГр/мин и 2 Гр – 100 сГр/мин. Адаптирующая доза 0,05 Гр, повреждающая доза - 2 Гр.

Цельную кровь облучали дозой 2 Гр g-излучения, через 4 ч. после экспозиции кровь центрифугировали при 1000 об/мин, 10 мин. для того, чтобы изолировать плазму. Сразу же после

центрифугирования плазму смешивали с необлученной кровью. Культивирование и хромосомный анализ проводили по стандартной методике [2].

Результаты и обсуждение

Исследование индукции эффекта свидетеля начато с решения вопроса выделяется ли он предоблученными клетками в плазму или передается при прямом контакте между клетками. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Определение фракции крови, содержащей “перемещающийся фактор”

Вариант	Клетки с аберрациями	Всего аберраций	Структурные аберрации	
			Хромосомного типа	Хроматидного типа
мужская цельная кровь+женская цельная кровь	12±3,2	15±3,6	4±1,9	11±3,1
мужские отмытые лимфоциты+женская цельная кровь	21±4,1	26±4,4	6±2,4	20±4,0
мужская плазма+ женская цельная кровь	12,7±2,8	12±3,2	3±1,7	9±2,8
2 Гр	26±4,4	30±4,6	7±2,5	23±4,2
0,05/2Гр	17±3,7	18±3,8	8±2,7	10±3,0

При совместном культивировании клеток крови разнополых доноров (цитогенетический маркер - У-хромосома) обнаружено, что предоблучение мужских лимфоцитов в дозе 0,05 Гр с последующим облучением смеси 2 Гр g-излучения снижает частоту хромосомных аберраций в женских лимфоцитах (12% по сравнению с 26% без предварительного облучения). Данный эффект наблюдается только в вариантах с предварительно облученной цельной кровью, но не с отмытыми лимфоцитами (21%).

Таким образом, можно предположить, что “перемещающийся фактор”, вырабатывается предоблученными лимфоцитами и выделяется в плазму, а не передается при прямом контакте между клетками.

Для исключения возможного влияния чужеродной плазмы при индукции эффекта свидетеля проведен эксперимент с использованием крови одного индивидуума. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Изучение эффекта добавления облученной *in vitro* плазмы к необлученной крови

Доза облучения плазмы (Гр)	Клетки с аберрациями	Всего аберраций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
0	6±2,4	6±2,4	2±1,4	4±1,9
2	11±3,1	11±3,1	6±2,4	5±2,2

Анализ результатов показал (табл. 2), что добавление облученной *in vitro* плазмы к необлученной крови увеличивает частоту хромосомных аберраций в не облученных клетках крови практически в 2 раза, т.е. наблюдается эффект свидетеля (*bystandereffect*). В данном эксперименте лимфоциты донора изначально, без каких-либо воздействий, содержали повышенный уровень хромосомных аберраций по сравнению со среднестатистическим (2%). Т.е. повышение хромосомных аберраций в необлученных клетках при их контакте с облученной свидетельствует о наличии определенного перемещающегося фактора стресс-сигнализации.

В спектре хромосомных аберраций встречались аберрации как хромосомного, так и хроматидного типов, первые были представлены двойными разрывами и фрагментами, дицентриками и транслокациями, вторые - одиночными разрывами, фрагментами и межхроматидными обменами.

Т.е. предоблученные в малой дозе клетки высвобождают некий фактор, который выделяется в плазму и который может передавать способность к стимуляции ДНК-репарации, выражаемую в виде реакции адаптивного ответа.

Как видно из результатов эксперимента добавление облученной плазмы приводит к более существенному снижению хромосомных аберраций при воздействии повреждающей дозы.

Таким образом, показано, что фактор стресс-сигнализации выделяется клетками в плазму или культуральную среду, который, с одной стороны, вызывает повышение хромосомных нарушений в интактных клетках (эффект свидетеля), с другой стороны, они же воспринимают его как защитный сигнал

