

На правах рукописи

КОЛЕСНИКОВА

Ирина Станиславовна

**РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ «ЭФФЕКТ СВИДЕТЕЛЯ» В
СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ РАЗНОПОЛЫХ
ДОНОРОВ.**

03.01.01 – радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2012

Работа выполнена в лаборатории радиационной генетики Федерального государственного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздравсоцразвития» (ФГУ РНЦ РХТ Минздравсоцразвития),
г. Санкт-Петербург

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Воробцова Ирина Евгеньевна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор Пелевина
Ирина Ивановна; Институт химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, руководитель
лаборатории радиационной биофизики и
экологии

Кандидат биологических наук, доцент Спивак
Ирина Михайловна; Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, старший научный сотрудник
лаборатории радиационной цитологии
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии Коми
научного центра Уральского отделения РАН

Защита состоится «__» _____ 2012г. в __ час. на заседании диссертационного
совета Д.501.001.65, Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
Биологический факультет МГУ, ауд. _____.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 г .

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук

Веселова Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Традиционно считали, что биологические эффекты ионизирующей радиации обусловлены только прямыми повреждениями молекул ДНК. Однако данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что в рамках классической «теории мишени» не всегда можно объяснить наблюдаемые медико-биологические последствия облучения, особенно при низких дозах лучевого воздействия. Ещё в 60-70х годах прошлого века было показано, что при относительно высоких дозах, кроме прямого механизма действия радиации на клетки, существует и опосредованный, называвшийся тогда дистанционным, гуморальным (Керкис и др, 1964; Zhumiell et al., 1971). Он выражался в том, что нарушения возникали не только в облучённых клетках, но и в гуморально связанных с ними интактных. Применительно к малым дозам ионизирующих излучений непрямой эффект радиации на клетки получил название радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» (РИЭС). Считается, что именно РИЭС может лежать в основе нестабильности генома потомства облучённых популяций клеток и организмов, радиационного канцерогенеза и неопухоловой отдалённой лучевой патологии при низкодозовом радиационном воздействии (Mothersill, Seymour, 2000). На основании большого количества экспериментальных данных были высказаны различные предположения о природе этих немишенных эффектов ионизирующих излучений. Однако до сих пор конкретные механизмы, лежащие в основе РИЭС до конца не ясны.

Как правило, в работах по изучению РИЭС используются достаточно сложные методические приёмы: инкубирование необлучённых клеток в среде от облучённых (Mothersill et al, 2001), облучение культур клеток излучением с высокой ЛПЭ (Nagasawa, Little, 1992), внутреннее облучение клеток путём включения в них радиоактивных изотопов (Bishayee et al., 2001), трансплантация облучённых клеток костного мозга необлучённым реципиентам (Watson et al., 2000), облучение отдельных клеток микропучками заряженных частиц (Folkard et al., 1997; Folkard et

al., 1997). Многие из них дорогостоящи и доступны лишь технически хорошо оснащённым лабораториям.

В связи с вышесказанным, продолжение исследования самого феномена РИЭС, а также поиск простых и доступных моделей для его выявления и изучения является актуальным.

Цели и задачи исследования.

Цель настоящей работы состояла в изучении РИЭС на модели совместной культуры человеческих лимфоцитов разнополых доноров.

Для достижения этой цели **были поставлены следующие задачи:**

1. Исследовать возможность развития опосредованного адаптивного ответа (ОАО) по критерию хромосомных aberrаций (ХА) в необлучённых лимфоцитах женских/мужских доноров при совместном культивировании с облучёнными в адаптирующей дозе лимфоцитами доноров противоположного пола при временной схеме адаптирующего и повреждающего воздействий $G_0 - G_1$.
2. Провести аналогичное исследование при временной схеме адаптирующего и повреждающего облучений $G_1 - G_1$.
3. Изучить взаимное влияние в совместной культуре облучённых в дозе 1 Гр и необлучённых лимфоцитов разнополых доноров на частоту спонтанных и индуцированных ХА.

Научная новизна и практическая значимость работы. В работе для исследования РИЭС был применён новый методический подход: совместное культивирование человеческих лимфоцитов периферической крови разнополых доноров. Кариотипическое различие мужских и женских клеток (XX и XY) даёт возможность отдельной регистрации генетических нарушений в облучённых лимфоцитах и в соседствующих с ними необлучённых. В настоящей работе РИЭС исследовали не только по морфологическому критерию (ХА), но и по одной из важных функциональных характеристик лимфоцитов – способности к адаптивному ответу. Было показано, что в необлучённых лимфоцитах при совместном культивировании с облучёнными в адаптирующей дозе клетками противоположного пола может развиваться адаптивный ответ по механизму «эффекта свидетеля». Данные пилотного эксперимента по совместному культивированию облучённых в

дозе 1 Гр и необлучённых лимфоцитов, свидетельствующие о возможности не только негативного (мутагенного) влияния облучённых лимфоцитов на необлучённые, но и обратного, позитивного (антимутагенного) эффекта, являются новыми и представляют интерес в связи с практической клинической проблемой профилактики осложнений после лучевой терапии онкологических пациентов.

Теоретическое значение работы. Полученные в работе результаты важны для понимания роли немишеных механизмов в развитии отдалённой лучевой патологии у людей, подвергшихся действию ионизирующей радиации в малых дозах. Они позволяют также приблизиться к пониманию причин развития так называемых «вторичных» опухолей у пациентов после лучевой терапии первичных. Метод совместно культивирования лимфоцитов разнополых доноров, апробированный в работе на примере РИЭС по цитогенетическому критерию адаптивного ответа, теоретически может использоваться и для изучения других немишеных эффектов малых доз ионизирующей радиации (геномная нестабильность, повышение радиочувствительности).

Положения, выносимые на защиту

1. При совместном культивировании лимфоцитов, облучённых в адаптирующей дозе 0.05 Гр, и неадаптированных лимфоцитов после разрешающего облучения в дозе 1 Гр наблюдается адаптивный ответ по критерию ХА как в предварительно облучённых клетках, так и в необлучённых клетках-свидетелях, при обеих использованных временных схемах адаптирующего и повреждающего воздействий (G_0-G_1 и G_1-G_1).
2. При совместном культивировании облучённых в дозе 1 Гр и необлучённых лимфоцитов наблюдается: в необлучённых клетках - повышение количества ХА по сравнению со спонтанным уровнем в монокультуре, в облучённых - снижение количества индуцированных ХА по сравнению с аналогично облучённой монокультурой.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на международной научно-практической конференции «Отдалённые последствия воздействия ионизирующего излучения» (Киев, 2007); международной школе-конференции «Системный контроль генетических и цитогенетических процессов»,

(Санкт-Петербург, 2007); научной конференции «От лучей рентгена – к инновациям XXI века: 90 лет со дня основания первого в мире рентгенорадиологического института» (Санкт-Петербург, 2008); V съезде ВОГиС (Москва, 2009); международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и загрязнение окружающей среды» (Сыктывкар, 2009); I Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2010); V международной научно-практической конференции "Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения" (Томск, 2010); VI съезде по радиационным исследованиям (радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность) «25 лет с момента аварии на Чернобыльской АЭС» (Москва, 2010); конференции молодых ученых Санкт-Петербурга «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», (Санкт-Петербург, 2010); международной конференции «Медико-биологические проблемы действия радиации» (Москва, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисов съездов и конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц и 4 рисунка. Список цитируемой литературы включает 205 источников, из них 148 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1.1. Характеристика материала.

В качестве материала для исследования использовали лимфоциты периферической крови 7 здоровых доноров (4 женского и 3 мужского пола) в возрасте от 19 до 32 лет, не имевших вредных привычек (табл.1).

Таблица 1. Поло-возрастная характеристика доноров.

	Исследование «эффекта свидетеля» по критерию адаптивного ответа				Исследование взаимного влияния необлучённых и облучённых в дозе 1 Гр лимфоцитов на частоту ХА
	Временная схема облучений G ₀ -G ₁		Временная схема облучений G ₁ -G ₁		
Кодовые номера доноров	1 (♀, 27)	2 (♂, 19)	3 (♀, 24)	4 (♂, 22)	6 (♂, 25)
	3 (♀, 24)	4 (♂, 22)	5 (♀, 22)	6 (♂, 23)	7 (♀, 32)

В скобках указаны пол и возраст донора (годы)

1.2. Схемы экспериментов

1.2.1. Исследование «эффекта свидетеля» по критерию адаптивного ответа при временной схеме адаптирующего и повреждающего облучений G₀-G₁

В экспериментах по исследованию РИЭС по критерию адаптивного ответа с использованием временной схемы адаптирующего и повреждающего воздействий G₀-G₁ кровь женского (№1, №3) либо мужского донора (№2, №4) облучали в адаптирующей дозе 0.05 Гр, культивировали совместно с интактными лимфоцитами донора противоположного пола в течение 5 часов, после чего культуру облучали в повреждающей дозе 1 Гр. На препаратах метафазных хромосом оценивали прямой (ПАО) и опосредованный (ОАО) адаптивный ответ по критерию частоты ХА. Параллельно ставили смешанные культуры лимфоцитов, которые облучали только в повреждающей дозе 1 Гр на 5 часу культивирования для оценки исходной радиостойчивости (РУ).

1.2.2. Исследование «эффекта свидетеля» по критерию адаптивного ответа при временной схеме адаптирующего и повреждающего облучений G₁-G₁

В экспериментах по исследованию РИЭС по критерию адаптивного ответа с использованием временной схемы адаптирующего и повреждающего воздействий G₁-G₁ лимфоциты крови каждого из доноров (№3, №5 и №4, №6) культивировали отдельно в течение 24 часов, затем кровь одного из пары доноров облучали в

адаптирующей дозе 0.05 Гр и культивировали совместно с лимфоцитами донора противоположного пола в течение 5 часов, на 29 часу культивирования совместную культуру облучали в повреждающей дозе 1 Гр. Параллельно ставили смешанные культуры лимфоцитов, которые облучали только в повреждающей дозе 1 Гр на 29 часу культивирования.

1.2.3. Сопоставление количества индуцированных в лимфоцитах ХА в моно- и совместных культурах при временной схеме облучения G₁-G₁.

Для сопоставления количества индуцированных ХА в моно- и совместных культурах при временной схеме адаптирующего и повреждающего облучений G₁-G₁ кровь женского донора № 5 через 24 часа культивирования (стадия G₁) облучали в адаптирующей дозе 0.05 Гр, после чего на 29 часу культивирования - в разрешающей дозе 1 Гр для оценки адаптивного ответа по частоте ХА в монокультуре. Параллельно ставили культуру необлучённых лимфоцитов этого же донора, которую облучали только в повреждающей дозе 1 Гр на 29 часу культивирования, для оценки исходной РУ по частоте ХА в монокультуре. Полученные после анализа препаратов результаты сравнивали с данными по оценке исходной РУ и ПАО женского донора №5 в смешанной культуре (п.1.2.2).

1.2.4. Исследование взаимного влияния необлучённых и облучённых в дозе 1 Гр лимфоцитов на частоту ХА.

В экспериментах по совместному культивированию облучённых в дозе 1 Гр и необлучённых лимфоцитов цельную кровь (лимфоциты G₀) женского или мужского донора облучали в дозе 1 Гр, культивировали совместно с необлучённой кровью донора противоположного пола, после чего готовили хромосомные препараты. Параллельно ставили монокультуры лимфоцитов обоих доноров, облучённых в дозе 1 Гр для оценки их собственной РУ, а также необлучённых лимфоцитов обоих доноров для оценки спонтанного уровня ХА.

1.3. Облучение лимфоцитов.

Облучение цельной крови (лимфоциты G₀) в адаптирующей дозе 0.05 Гр γ -излучения Co⁶⁰ проводили на аппарате Рокус-М в пластиковых пробирках «Эппендорф», помещённых в парафиновый контейнер, при мощности дозы 0.032 Гр/мин. Облучение культивируемых лимфоцитов в адаптирующей дозе 0.05 Гр на стадии G₁ клеточного цикла проводили на рентгеновском аппарате РУМ-17 в

бакпечатках, помещённых в парафиновый контейнер, при мощности дозы 0.057 Гр/мин. Облучение культур лимфоцитов в разрешающей дозе 1 Гр на ранней (5 часов культивирования) и поздней (29 часов культивирования) стадии G₁ проводили на рентгеновском аппарате РУМ-17 в бакпечатках, помещённых в парафиновый контейнер, при мощности дозы 0.444 Гр/мин. Облучение цельной крови тормозным излучением в дозе 1 Гр проводили на линейном ускорителе электронов SL-75-5 в бакпечатках, помещённых в парафиновый контейнер, при мощности дозы 4.55 Гр/мин.

1.4. Приготовление метафазных препаратов лимфоцитов крови и микроскопический анализ препаратов.

Культивирование лимфоцитов крови осуществляли по стандартной методике (IAEA, 2001). Общее время культивирования во всех экспериментах составляло 48 ч. Для гарантии учёта только тех клеток, которые находятся на стадии первого митотического деления, проводили FPG-окрашивание по методу, описанному (Kulka et al, 1995). Рутинный цитогенетический анализ выполняли на световых микроскопах «Микромед-1», «Бимам» (ЛОМО, Россия) и Axioplan (Carl Zeiss, Germany) в проходящем свете под масляной иммерсией при суммарном увеличении x1000. На препаратах смешанных и монокультур просматривали не менее 400-500 метафаз I пострадиационного митоза каждого пола для облучённых лимфоцитов и не менее 1000 метафаз I культурального митоза для необлучённых лимфоцитов, регистрируя на препаратах смешанных культур ХА отдельно в женских (XX) и мужских (XY) клетках. Учитывали следующие типы ХА: дицентрические и кольцевые хромосомы, парные фрагменты (включая точечные двойные и кольцевые ацентрические фрагменты), одиночные фрагменты. Всего было проанализировано 20201 метафазных клеток.

1.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ GraphPad Prism и Statgraphics Plus 5.1. Для оценки достоверности различий между вариантами использовали t-критерий Стьюдента, а также его модификацию для серии парных сравнений, двухфакторный дисперсионный анализ и непараметрический парный критерий Вилкоксона. Выраженность адаптивного ответа

рассчитывали следующим образом: для ПАО: $((PY-PAO)/PY)*100\%$; для ОАО: $((PY-OAO)/PY)*100\%$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Влияние облучения в дозе 0.05 Гр на развитие адаптивного ответа в облучённых (ПАО) и необлучённых (ОАО) лимфоцитах при совместном культивировании.

2.1.1. Временная схема адаптирующего и повреждающего облучений G_0-G_1

В таблице 2 представлены результаты экспериментов по исследованию РИЭС по критерию адаптивного ответа с использованием временной схемы адаптирующего и повреждающего воздействий G_0-G_1 , выполненного на двух парах доноров.

В большинстве случаев частота индуцированных облучением в дозе 1 Гр ХА после предварительного адаптирующего облучения снижалась как в непосредственно предоблучённых лимфоцитах, так и в соседствовавших с ними. По общей частоте ХА достоверным ПАО оказался во всех 4 случаях. Достоверный ОАО был зарегистрирован в 2 случаях из 4 (у доноров №1 и №2). Снижение количества ХА по сравнению с исходной РУ при временной схеме G_0-G_1 как при ПАО, так и при ОАО для доноров, у которых он был достоверен, происходило в основном за счёт дицентрических хромосом. Достоверное снижение количества ацентрических парных фрагментов наблюдалось только при ОАО у одного донора донора (№1).

2.1.2. Временная схема адаптирующего и повреждающего облучений G_1-G_1

В таблице 3 представлены результаты исследования РИЭС по критерию адаптивного ответа с использованием временной схемы адаптирующего и повреждающего воздействий G_1-G_1 , выполненного на двух парах доноров.

Во всех случаях общая частота индуцированных облучением в дозе 1 Гр ХА после предварительного адаптирующего облучения снижалась, в то же время достоверным ПАО оказался в 3 случаях из 4 (недостоверен у донора №6). Достоверный ОАО также был зарегистрирован в 3 случаях из 4 (недостоверен у донора №5). У донора №5 наблюдался достоверный ПАО при отсутствии достоверного ОАО по общему количеству ХА, хотя снижение количества парных и одиночных фрагментов при ОАО у данного донора было достоверным. У донора №6 не было выявлено ПАО, но наблюдался достоверный ОАО. Уменьшение уровня ХА в экспериментах с

Таблица 2. Количество индуцированных ХА (1 Гр) в адаптированных (0.05 Гр) и неадаптированных женских/мужских лимфоцитах при их совместном культивировании с адаптированными/неадаптированными клетками донора противоположного пола при схеме облучений G₀-G₁.

Кодовый номер донора	Пол		Проанализировано клеток	Количество на 100 клеток				
				АК	ХА	Диц.+центр. кольца	Ацентрические парные фрагменты	Одиночные фрагменты
1	♀	РУ	572	36.9±2.0	44.1±2.1	27.0±1.9	14,7±1.5	2.4±0.6
		ПАО	570	30.2±1.9*	34.4±2.0*	21.1±1.7*	11.6±1.3	1.8±0.5
		ОАО	548	28.1±1.9*	31.2±2.0*	19.9±1.7*	9.7±1.3*	1.6±0.5
2	♂	РУ	428	33.2±2.3	39.7±2.4	20.6±2.0	17,3±1.8	1.9±0.6
		ПАО	451	28.8±2.1	32.8±2.2*	17.1±1.8	14.0±1.6	1.8±0.6
		ОАО	429	27.3±2.2	32.9±2.3*	17.3±1.8	13.8±1.7	2.6±0.7
3	♀	РУ	546	29.3±1.9	33.9±2.0	19.8±1.8	12.5±1.4	1.6±0.5
		ПАО	494	25.9±2.0	28.5±2.0*	14.2±1.6*	12.6±1.5	1.8±0.6
		ОАО	482	26.6±2.0	32.0±2.1	17.3±1.7	13.5±1.5	1.2±0.5
4	♂	РУ	454	32.4±2.2	38.1±2.3	19.2±1.8	16.7±1.8	2.2±0.6
		ПАО	516	28.9±2.0	32.0±2.1*	19.1±1.7	12.8±1.5	1.6±0.5
		ОАО	506	32.2±2.1	38.3±2.2	22.0±1.8	14.8±1.6	1.6±0.5

* - отличие от соответствующего показателя для РУ достоверно ($p \leq 0.05$, t-критерий Стьюдента).

Таблица 3. Количество индуцированных ХА (1 Гр) в адаптированных (0.05 Гр) и неадаптированных женских/мужских лимфоцитах при их совместном культивировании с адаптированными/неадаптированными клетками донора противоположного пола при схеме облучений G₁-G₁.

Кодовый номер донора	Пол		Количество на 100 клеток					
			Проанализировано клеток	АК	ХА	Диц.+центр. кольца	Ацентрические парные фрагменты	Одиночные фрагменты
3	♀	РУ	558	32.6±2.0	40.3±2.1	11.1±1.3	22.9±1.8	5.9±1.0
		ПАО	1150	29.2±1.3	34.7±1.4*	10.8±0.9	19.7±1.2	3.7±0.6
		ОАО	609	24.1±1.7*	28.6±1.8*	7.9±1.1*	17.1±1.5*	3.6±0.8
4	♂	РУ	441	40.8±2.3	54.9±2.4	9.5±1.4	35.6±2.3	9.8±1.4
		ПАО	391	33.8 ± 2.4*	46.0 ± 2.5*	7.2 ± 1.3	32.2 ± 2.4	4.6±1.1*
		ОАО	787	29.9±1.6*	38.2±1.7*	8.1±1.0	26.7±1.6*	2.6±0.6*
5	♀	РУ	408	44.9 ± 2.5	58.8 ± 2.4	16.4 ± 1.8	32.1 ± 2.3	9.3±1.4
		ПАО	458	33.0 ± 2.2*	45.0 ± 2.3*	14.4 ± 1.6	25.1 ± 2.0*	4.8±1.0*
		ОАО	455	40.0 ± 2.3	53.6 ± 2.3	21.8 ± 1.9*	26.6 ± 2.1*	4.4±1.0*
6	♂	РУ	591	42.3 ± 2.0	66.5 ± 1.9	13.2 ± 1.4	46.4 ± 2.1	6.6±1.0
		ПАО	543	45.9 ± 2.1	62.6 ± 2.1	17.0 ± 1.6	40.5 ± 2.1*	5.2±1.0
		ОАО	540	36.9 ± 2.1*	51.3 ± 2.2*	11.3 ± 1.4	30.4 ± 2.0*	7.8±1.2

* - отличие от соответствующего показателя для РУ достоверно ($p \leq 0.05$, t-критерий Стьюдента).

использованием временной схемы облучений G_1-G_1 как при ПАО, так и при ОАО происходило в основном за счёт сокращения количества ацентрических парных фрагментов. Достоверное снижение количества дицентрических хромосом наблюдалось только при ОАО у одного донора (№3).

2.1.3. Общий статистический анализ данных по всем донорам при обеих временных схемах адаптирующего и разрешающего облучений

В 7 случаях из 8 при обеих временных схемах облучения (G_0-G_1 и G_1-G_1) наблюдался достоверный ПАО. Достоверный ОАО был зарегистрирован в 5 случаях из 8, ещё в 2 случаях он наблюдался как тенденция к снижению количества ХА (табл. 2, 3).

При обработке данных по всем донорам и обеим схемам облучения с помощью t -критерия Стьюдента для парных сравнений и непараметрического критерия Вилкоксона (Манна-Уитни) снижение общей частоты ХА в лимфоцитах как при непосредственном адаптирующем облучении, так и при совместном культивировании с адаптированными, оказалось достоверным ($p < 0.05$).

Был также проведён двухфакторный дисперсионный анализ (фактор А – наличие или отсутствие адаптирующего облучения, фактор В – временная схема облучений (G_0-G_1 или G_1-G_1)) индивидуальных результатов по всем донорам, который подтвердил влияние на частоту индуцированных ХА в лимфоцитах доноров предварительного низкодозового облучения лимфоцитов (для ОАО $F = 4.42$, $p \leq 0.05$, для ПАО $F=3.54$, $p=0.08$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности передачи сигнала к развитию адаптивного ответа от облучённых в адаптирующей дозе лимфоцитов мужского/женского донора клеткам-свидетелям. Выявилось также достоверное влияние временной схемы адаптирующего и повреждающего воздействий на общее количество индуцированных ХА как при ПАО, так и при ОАО (при ПАО $F=15.27$, $p<0.01$, при ОАО $F=9.34$, $p<0.01$). При временной схеме облучений G_1-G_1 частоты индуцированных ХА по всем оценкам (РУ, ПАО, ОАО) оказались выше, чем при G_0-G_1 . То есть, лимфоциты на 29 часу культивирования (поздняя стадия G_1) более чувствительны к повреждающему облучению в дозе 1 Гр, чем лимфоциты на 5 часу культивирования (ранняя стадия G_1). Об этом свидетельствуют как средние по всем донорам значения частот ХА, которые составили 55.1 ± 1.1 для поздней стадии G_1 и 39.0 ± 1.1 % для ранней стадии

G₁, так и результаты той пары доноров №3 и №4, для лимфоцитов которых применялись обе временные схемы экспериментов (см. табл. 2, 3). Это соответствует литературным данным о большей радиочувствительности поздней стадии G₁ по сравнению с ранней (Севанькаев, 1987).

В трёх экспериментах из четырёх частота индуцированных облучением в дозе 1 Гр ХА в лимфоцитах мужских доноров превышала их частоту в лимфоцитах женских доноров, составив в среднем по всем женским донорам 44.2 ± 1.1 и по всем мужским донорам 51.1 ± 1.1 ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента). Таким образом, женские лимфоциты оказались более радиоустойчивы, чем мужские. Это согласуется с литературными данными о большей устойчивости женских организмов к действию ионизирующей радиации (Das, Sharman, 1981; Wang et al., 2000).

2.1.4. Выраженность ПАО и ОАО у доноров при различных временных схемах облучений

В таблице 4 представлены данные по выраженности ПАО и ОАО при различных временных схемах эксперимента у разных доноров.

Пределы варьирования выраженности ПАО составили от 5.9 до 23.5 %, ОАО – от -0.5 % до 34.4 %, то есть, наблюдается значительная межиндивидуальная изменчивость в способности доноров как к прямому, так и к опосредованному адаптивному ответу, при этом варьирование выраженности ОАО было большим, чем ПАО.

В трёх случаях из четырёх выраженность ПАО была выше в лимфоцитах женских доноров по сравнению с мужскими. В среднем она составила 20.3% у женщин vs 13.9% - у мужчин. Это позволяет говорить о тенденции к большей выраженности ПАО у женских доноров по сравнению с мужскими. Каких-либо половых различий в выраженности ОАО не обнаружено (табл.4). Литературные данные о межполовых различиях в способности к РИАО противоречивы (Venkat et al., 1996; Moskalev et al., 2009; Moskalev et al., 2011).

Не было обнаружено каких либо систематических различий между выраженностью ПАО при разных временных схемах экспериментов (табл.4). Для ОАО выраженность составила: 12.9% - для G₀-G₁ и 23.8% - для G₁-G₁. Таким образом, наблюдается тенденция к большей выраженности ОАО при временной схеме G₁-G₁

Таблица 4. Выраженность ПАО и ОАО при различных схемах эксперимента в лимфоцитах разных доноров (%).

Схема эксперимента	Кодовые № доноров	ПАО		ОАО	
		доноры женского пола	доноры мужского пола	доноры женского пола	доноры мужского пола
G ₀ -G ₁	1, 2	22.0	17.4	29.3	17.1
	3, 4	15.9	16.0	5.6	-0.5
Средняя выраженность для временной схемы G ₀ -G ₁		17.8		12.9	
G ₁ -G ₁	3, 4	19.6	16.2	29.0	34.4
	5, 6	23.5	5.9	8.8	22.9
Средняя выраженность для временной схемы G ₁ -G ₁		16.2		23.8	
Средняя выраженность по полу		20.3	13.9	18.2	18.5

по сравнению с G₀-G₁. Это согласуется с литературными данными о том, что в большинстве случаев адаптирующее облучение лимфоцитов на стадии G₁ наиболее эффективно для индукции в них адаптивного ответа (Shadley et al., 1987; Wang et al., 1991). Кроме того, в литературе имеются данные, указывающие на необходимость пролиферативной активности клеток для индукции РИЭС (Belyakov et al., 2003), поэтому адаптирующее облучение нестимулированных лимфоцитов вполне могло оказаться менее эффективным для индукции ОАО, чем адаптация активно пролиферирующих клеток на поздней стадии G₁.

2.2. Сопоставление результатов облучения моно- и совместных культур при одинаковой временной схеме адаптирующего и разрешающего облучений (G₁-G₁).

В таблице 5 представлены результаты сопоставления количества индуцированных ХА в моно- и совместных культурах лимфоцитов женского донора

Таблица 5. Радиоустойчивость (1 Гр) и адаптивный ответ (0.05 Гр + 1 Гр) лимфоцитов женского донора №5 в монокультуре и в совместной культуре с неадаптированными лимфоцитами мужского донора №6.

	Количество на 100 клеток			
	Монокультура (♀ донор №5, 1Гр)	Совместная культура (♀ донор №5 + ♂ донор №6), 1Гр	Монокультура (♀ донор №5, 0.05 Гр), 1Гр	Совместная культура (♀ донор №5 0.05 Гр + ♂ донор №6), 1Гр
Кол-во проанализиро- ванных клеток	500	408	500	458
АК	40,8±2,2	44.9 ± 2.5	34,8±2.1	33.0 ± 2.2
ХА	52.0±2,2	58.8 ± 2.4	44,6±2.2	45.0 ± 2.3
Диц.+ центр. кольца	13, 4±1.5	16.4 ± 1.8	11.4±1.4	14.4 ± 1.6
Ацентрические парные фрагменты	34,8±2,1	32.6 ± 2.3	31,6±2.0	25.1 ± 2.0*
Одиночные фрагменты	3,6 ± 0.8	9.3 ± 1.4*	1.6 ± 0.6	4.8 ± 1.0*

- - отличие от соответствующего показателя в монокультуре достоверно ($p \leq 0.05$, t-критерий Стьюдента).

№5. Не было обнаружено достоверных различий в общем количестве ХА, индуцированных дозой 1 Гр, т. е. в исходной РУ, между лимфоцитами донора №5 в монокультуре и в смешанной - с клетками донора противоположного пола №6. Это согласуется с данными работы (Шеметун, Пилинская, 2005) об отсутствии каких-либо достоверных различий в частоте спонтанных ХА между клетками в монокультурах и при совместном культивировании с клетками доноров противоположного пола. В то же время количество одиночных фрагментов в лимфоцитах донора №5 в совместной культуре достоверно превышало их количество в монокультуре. Не было обнаружено достоверных различий в общем количестве индуцированных ХА между лимфоцитами в монокультуре, облучёнными в дозе 0.05 Гр, а затем – в дозе 1 Гр, и аналогично облучёнными лимфоцитами в совместной культуре. В то же время количество парных фрагментов в монокультуре лимфоцитов донора №5 оказалось достоверно ниже, а одиночных – достоверно выше по сравнению с их количеством в совместной

культуре. В настоящей работе собственно парные фрагменты (абберации хромосомного типа) и изоделции (абберации хроматидного типа) учитывали совместно, поэтому, возможно, часть хромосомных аббераций являлись на самом деле хроматидными. По сумме парных и одиночных фрагментов моно- и смешанные культуры не различались как для неадаптированных (38.4 ± 2.2 vs 41.0 ± 2.4), так и для адаптированных (33.2 ± 2.1 vs 29.9 ± 2.1) лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при данной схеме адаптирующего и разрешающего облучений совместное культивирование клеток разнополых доноров само по себе не влияет на общее количество индуцированных облучением в дозе 1 Гр ХА как в неадаптированных, так и в адаптированных лимфоцитах и, следовательно, не должно модифицировать величину ПАО и ОАО лимфоцитов в соответствующих экспериментах п. 2.1.

2.3. Влияние облучения лимфоцитов в дозе 1 Гр на спонтанную частоту ХА в необлучённых лимфоцитах при их совместном культивировании.

В таблице 6 представлены результаты экспериментов по совместному культивированию необлучённых лимфоцитов с клетками донора противоположного пола, облучёнными в дозе 1Гр.

В необлучённых лимфоцитах мужского донора при их совместном культивировании с облучёнными в дозе 1 Гр женскими лимфоцитами общее количество АК и ХА, а также парных и одиночных фрагментов оказалось достоверно выше по сравнению с соответствующими спонтанными уровнями в монокультуре. Следует отметить, что при отсутствии ацентрических парных фрагментов в монокультуре необлучённых лимфоцитов мужского донора они наблюдались при их совместном культивировании с облучёнными лимфоцитами женского донора. Для женских лимфоцитов

Таблица 6. Количество ХА в необлучённых лимфоцитах мужского донора №6 и женского донора №7 в монокультуре и при совместном культивировании с лимфоцитами донора противоположного пола, облучёнными в дозе 1 Гр.

	Количество на 100 клеток			
	Монокультура (♂ донор №6)	Совместная культура (♂ донор №6 + ♀ донор №7 1	Монокультура (♀ донор №7)	Совместная культура (♀ донор №7 + ♂ донор №6 1

		Гр)		Гр)
Кол-во проанализированных клеток	1000	1062	1107	1031
АК	0.90 ± 0.30	3.67 ± 0.58 *	2.71 ± 0.49	4.36 ± 0.64*
ХА	0.90 ± 0.30	3.77 ± 0.58 *	3.07 ± 0.53	4.66 ± 0.66
Диц.+ центр. кольца	0	0	0.09 ± 0.09	0.10 ± 0.10
Ацентрические парные фрагменты	0	1.69 ± 0.40*	1.17 ± 0.33	1.45 ± 0.37
Одиночные фрагменты	0.90 ± 0.30	2.07 ± 0.44*	1.81 ± 0.41	3.01 ± 0.54

* - отличие от соответствующего показателя в монокультуре достоверно ($p \leq 0.05$, t-критерий Стьюдента).

наблюдалась та же тенденция, хотя различия достоверны только по общему количеству АК.

Повышение количества повреждений хромосом при совместном культивировании с облучёнными клетками в лимфоцитах мужского донора было значительно более выражено, чем в лимфоцитах женского: в совместной культуре с облучёнными лимфоцитами количество ХА в мужских клетках превышало спонтанный уровень в монокультуре в 4.2 раза, в то время как в женских - в 1.5 раза. В то же время, как видно из табл. 6, спонтанный уровень как общего количества ХА в женских клетках был значительно выше. Вероятно, на фоне высокого спонтанного уровня ХА у женского донора влияние совместного культивирования с облучёнными мужскими лимфоцитами не проявилось как достоверное.

Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о существовании опосредованного мутагенного влияния облучённых в дозе 1 Гр лимфоцитов на необлучённые клетки доноров противоположного пола при их совместном культивировании.

2.4. Влияние необлучённых лимфоцитов на частоту ХА в лимфоцитах, облучённых в дозе 1 Гр, при их совместном культивировании.

В таблице 7 представлены результаты оценки количества ХА, индуцированных облучением в дозе 1 Гр в монокультурах лимфоцитов и при их совместном культивировании с необлучёнными клетками доноров противоположного пола.

В облучённых лимфоцитах обоих доноров при совместном культивировании с необлучёнными лимфоцитами донора противоположного пола общее количество индуцированных ХА и АК оказалось достоверно ниже, чем в соответствующих монокультурах. В женских лимфоцитах достоверным оказалось снижение количества как дицентрических хромосом, так и ацентрических парных фрагментов, в мужских лимфоцитах достоверным было снижение только ацентрических парных фрагментов. Общее количество индуцированных ХА при совместном культивировании с необлучёнными лимфоцитами противоположного пола уменьшалось в 2.4 раза в клетках женщины и в 1.9 раз – в клетках мужчины. Таким образом, в совместной культуре лимфоцитов разнополых доноров наблюдается опосредованный антимуtagenный эффект необлучённых клеток на облучённые. Этот эффект может представлять существенный интерес с точки зрения возможности его использования в профилактике лучевых поражений и осложнений после радиотерапии у онкологических пациентов.

Таблица 7. Количество ХА, индуцированных облучением в дозе 1 Гр, в лимфоцитах женского донора №7 и мужского донора №6 в монокультуре и при совместном их культивировании с необлучёнными лимфоцитами донора противоположного пола.

	Количество на 100 клеток			
	Монокультура (♀ донор №7 1 Гр)	Совместная культура (♀ донор №7 1 Гр + ♂ донор №6)	Монокультура (♂ донор №6 1 Гр)	Совместная культура (♂ донор №6 1 Гр + ♀ донор №7)
Кол-во проанализиро- ванных клеток	500	431	500	652

АК	18.4 ± 1.7	7.7 ± 1.3 *	12.8 ± 1.5	7.1 ± 1.0 *
ХА	19.8 ± 1.8	8.4 ± 1.3 *	14.0 ± 1.6	7.5 ± 1.0 *
Диц.+ центр. кольца	12.8 ± 1.5	5.8 ± 1.1 *	6.0 ± 1.1	4.0 ± 0.8
Ацентрические парные фрагменты	7.0 ± 1.1	2.6 ± 0.8 *	8.0 ± 1.2	3.5 ± 0.7 *

- - отличие от соответствующего показателя в монокультуре достоверно ($p \leq 0.05$, t-критерий Стьюдента).

Совокупность результатов настоящей работы позволяет заключить, что модель совместного культивирования лимфоцитов разнополых доноров позволила выявить РИЭС при облучении клеток как в низкой, так и в высокой дозе по функциональному (ОАО) и морфологическому (ХА) критериям соответственно.

Следует отметить основные достоинства метода:

1. Возможность работать на нормальных человеческих клетках;
2. Возможность регистрировать повреждения отдельно в облучённых и необлучённых лимфоцитах человека в смешанной культуре благодаря кариотипическим отличиям полов;
3. Возможность оценивать РИЭС не только по структурным (ХА), но и по функциональным критериям (адаптивный ответ);
4. Возможность изучать количественные закономерности РИЭС (меняя дозу облучения, соотношение и время контакта облучённых и необлучённых лимфоцитов);
5. Возможность исследовать РИЭС при облучении лимфоцитов не только *in vitro*, но и *in vivo* (космонавты, онкопациенты после лучевой терапии, ликвидаторы радиационных аварий).
6. Техническая простота и экономичность метода;
7. Возможность использовать в качестве морфологического критерия не только нестабильные ХА, но и другие критерии: транслокации (в сочетании с FISH с зондом, специфичным к прицентромерному району Y-хромосомы, и коктейлями WCP-зондов для любых хромосом), микроядра (в сочетании с FISH с CEP-зондом для Y-хромосомы).

3. ВЫВОДЫ

1. Совместное культивирование лимфоцитов разнополых доноров является простой, адекватной и экономичной моделью для исследования непрямых эффектов ИР, развивающихся по механизму РИЭС.
2. В женских (мужских) лимфоцитах, культивированных совместно с предоблучёнными в дозе 0.05 Гр лимфоцитами доноров противоположного пола, наблюдается ОАО, развивающийся по механизму ЭС.
3. ОАО наблюдается в клетках-свидетелях как при временной схеме адаптирующего и повреждающего воздействий G_0-G_1 , так и при временной схеме G_1-G_1 .
4. Наблюдается значительная межиндивидуальная вариабельность в способности доноров к ОАО.
5. В пилотном эксперименте на модели совместной культуры лимфоцитов 2х разнополых доноров показано, что в необлучённых лимфоцитах, культивированных совместно с облучёнными в дозе 1 Гр клетками, увеличивается частота ХА по сравнению со спонтанным уровнем, а в облучённых – снижается количество индуцированных ХА по сравнению с уровнем в монокультуре.

4. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. И.Е. Воробцова, **И.С. Колесникова**. Исследование радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» на модели адаптивного ответа в совместной культуре лимфоцитов людей разного пола. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. т.47. №6. С.645-649.
2. **Колесникова И.С.**, Воробцова И.Е.. Радиационно-индуцированный «эффект свидетеля», выявляемый по адаптивному ответу при совместном культивировании лимфоцитов разнополых доноров // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т.51. №5. С.542-548.

3. Воробцова И.Е., **Колесникова И.С.** Исследование «эффекта свидетеля» на примере прямого и опосредованного адаптивного ответа новым методом совместного культивирования лимфоцитов разнополых доноров. // Тезисы докладов международной научно-практической конференции «Отдалённые последствия воздействия ионизирующего излучения», Киев, 23-25 мая 2007 г., с.191-192.
4. И. Е. Воробцова, А. В. Семёнов, Н. Е Любимова, **И. С. Колесникова**, Ю. В. Гусева, Н. А. Пулатова. Значение цитогенетических исследований для оценки медицинских последствий действия ионизирующих излучений. // Тезисы докладов Международной конференции «Новые направления в радиобиологии», г. Москва, 6-7 июня 2007 г., с. 14-17.
5. **Колесникова И.С.** Изучение радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» с помощью совместного культивирования лимфоцитов разнополых доноров. // Тезисы международной школы-конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения М.Е. Лобашёва, Санкт-Петербург, 10-13 ноября 2007 г., с. 58-59.
6. **И.С. Колесникова**, И.Е. Воробцова. Исследование радиоиндуцированного «эффекта свидетеля» в совместной культуре лимфоцитов разнополых доноров. // Тезисы докладов научной конференции «От лучей рентгена – к инновациям XXI века: 90 лет со дня основания первого в мире рентгенорадиологического института (Российского научного центра радиологии и хирургических технологий)». Санкт-Петербург. 8-10 октября 2008 г. С.332-333.
7. **И.С. Колесникова**, И.Е. Воробцова. Изучение радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» методом совместного культивирования лимфоцитов доноров разного пола // Тезисы V съезда ВОГиС, Москва, 21 – 28 июня 2009 г. С.16.
8. **Колесникова И.С.**, Воробцова И.Е., Давитая Е.С. Изучение радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» методом совместного культивирования лимфоцитов разнополых доноров» // Материалы международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и загрязнение окружающей среды», Сыктывкар, 28 сентября -1 октября 2009 г. С.56-58.
9. **Колесникова И.С.**, Воробцова И.Е. Адаптивный ответ и «эффект свидетеля» при совместном культивировании лимфоцитов разнополых доноров // Тезисы V международной научно-практической конференции "Медицинские и

экологические эффекты ионизирующего излучения", посвящённой 10-летию организации Северского биофизического научного центра ФМБА России. Томск. 13-14 апреля 2010 г. С.87.

10. **Колесникова И.С.**, Воробцова И.Е. Опосредованный адаптивный ответ, выявляемый при совместном культивировании лимфоцитов разнополых доноров // Тезисы I Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». Санкт-Петербург. 6-9 июня 2010 г. С.140.

11. **Колесникова И.С.**, Воробцова И.Е. Опосредованный адаптивный ответ, развивающийся по механизму «эффекта свидетеля» в совместной культуре лимфоцитов разнополых доноров // Тезисы VI съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность). 25 лет с момента аварии на Чернобыльской АЭС. Москва. 25-28 октября 2010 г. Т.1. С. 57.

12. **Колесникова И.С.** Адаптивный ответ, возникающий как «эффект свидетеля» в совместной культуре лимфоцитов разнополых доноров. // Материалы конференции молодых ученых Санкт-Петербурга «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», посвящённой 120-летию НИИЭМ СЗО РАМН. Санкт-Петербург. 21-22 декабря 2010 г. Медицинский академический журнал. Т.10. №5. С.122.