УДК 576.316+575.113:616.15:614.876

О. В. Шеметун✉

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

ПОШКОДЖЕННЯ ХРОМОСОМ ПРИ ОПРОМІНЕННІ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ ТА РОЗВИТКУ ЕФЕКТУ СВІДКА

Мета: дослідження розподілу радіаційно-індукованих пошкоджень серед хромосом і їх бендів в опромінених in vitro лімфоцитах крові людини та в неопромінених клітинах-свідках.

Матеріал і методи дослідження: культивування лімфоцитів периферичної крові людини за напівмікрометодом D. A. Hungerford, моделювання радіаційно-індукованого ефекту свідка в змішаних культурах з опромінених in vitro та неопромінених лімфоцитів крові осіб різної статі, GTG-забарвлення метафазних хромосом та їх цитогенетичний аналіз.

Результати. Ідентифіковано точки розривів хромосом при формуванні аберацій в опромінених in vitro в дозах 0,25 Гр (95 розривів в 1248 клітинах) і 1,0 Гр (227 розривів в 726 клітинах) лімфоцитах периферичної крові людини та в неопромінених клітинах-свідках при їх сумісному культивуванні з опроміненими in vitro лімфоцитами людини (51 розрив в 1137 клітинах при опроміненні суміжної популяції лімфоцитів в дозі 0,25 Гр та 75 розривів в 1321 клітині при опроміненні суміжної популяції лімфоцитів в дозі 1 Гр). Досліджено розподіл зареєстрованих пошкоджень серед хромосом та їх бендів.

Висновки. В опромінених in vitro лімфоцитах периферичної крові людини та клітинах-свідках частота пошкоджених бендів та кількість розривів, які локалізувались в них, перевищувала контрольну ($p < 0,01$). Як при безпосередньому пошкодженні іонізуючою радіацією, так і при формуванні розривів внаслідок індукції ефекту свідка, хромосоми пошкоджувались відповідно до їх відносної довжини. Розташування бендів, в яких зареєстровано більшу кількість розривів, співпадало з «гарячими точками» пошкоджуваності хромосом при опроміненні та фрагільними сайтами. Чутливішими до пошкодження були G-негативні еухроматинові смуги хромосом, в яких локалізувались 82-88 % розривів. Пошкоджуваність теломерних районів в опромінених клітинах не мала достовірної різниці з контролем, а у клітинах свідках була нижче контрольної ($p < 0.05$).

Ключові слова: опромінення in vitro, радіаційно-індукований ефект свідка, аберації хромосом, точки розривів, лімфоцити периферичної крові людини.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2016. Вип. 21. С. 149–158.

✉ Шеметун Олена Володимирівна, e-mail: shemetun@email.ua

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016. Вип. 21.

O. V. Shemetun✉

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

Damage of chromosoms under irradiation of human blood lymphocytes and development of bystander effect

Objective: the research the distribution of radiation-induced damages among chromosomes and their bands in irradiated in vitro human blood lymphocytes and in unirradiated bystander cells.

Material and methods of research: cultivation of human peripheral blood lymphocytes by semi-micromethod D.A. Hungerford, modeling of radiation-induced bystander effect in mixed cultures consisting of irradiated in vitro and non-irradiated blood lymphocytes from persons of different gender, GTG-staining of metaphase chromosomes and their cytogenetic analysis.

Results. Break points in chromosomes under the formation of aberrations were identified in exposed in vitro human peripheral blood lymphocytes in doses 0.25 Gy (95 breaks in 1248 cells) and 1.0 Gy (227 breaks in 726 cells) and in non-irradiated bystander cells under their joint cultivation with irradiated in vitro human lymphocytes (51 breaks in 1137 cells at irradiation of adjacent populations of lymphocytes in dose 0.25 Gy and 75 breaks in 1321 cells at irradiation of adjacent population of lymphocytes in a dose 1.0 Gy). The distribution of injuries among the chromosomes and their bands was investigated.

Conclusions: in radiation-exposed in vitro human peripheral blood lymphocytes as well as in bystander cells the frequency of damaged bands and number of breaks which localized in them exceeded the control value ($p < 0.01$). As under direct radiation exposure, as under formation of breaks due to induction of bystander effect, chromosomes were damaged according to their relative length. Location of bands with increasing number of breaks coincided with the «hot spots» of chromosome damage following irradiation and fragile sites. More sensitive to damage were G-negative euchromatin chromosome bands, in which were localized 82-88 % breaks. Damageability of telomeric regions in the irradiated cells had no significant difference from the control, while in bystander cells was lower than control value ($p < 0.05$).

Key words: irradiation in vitro, radiation-induced bystander effect, chromosome aberrations, break points, human peripheral blood lymphocytes.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016;21:149–158.

ВСТУП

Питання про невипадковість пошкодження іонізуючим випромінюванням окремих хромосом та їх бендів при опроміненні організму людини залишається до кінця не з'ясованим [1–3]. Разом з тим, відкриття радіаційно-індукованого ефекту свідка поставило вказану проблему з новою гостротою, адже внаслідок його розвитку пошкоджень можуть зазнавати віддалені від опроміненої мішені клітини в усьому організмі [4–7]. Результатом можуть бути виникнення хромосомної нестабільності і зростання частоти аберацій хроматидного типу, порушення регуляції і активації протоонкогенів, інактивації супресорів онкогенів, інактивації та пошкодження генів репарації та генів-регуляторів клітинного циклу, що може сприяти розвитку радіаційно-індукованого канцерогенезу в неопромінених тканинах і органах організму людини [5, 8–10].

INTRODUCTION

The question about nonrandomnes the damage by ionizing radiation of certain chromosomes and their individual bands following human irradiation remains not fully elucidated [1–3]. However, the discovery of radiation-induced bystander effect set this problem with a new urgency, because as a result of its development may suffer cells throughout the body which distant from the exposure target [4–7]. The result can be the emergence of chromosomal instability and increase the frequency of chromatid aberrations, violation the regulation and activation of protooncogenes, inactivation of oncogene's suppressors, inactivation and damage of repair genes and gene regulators of the cell cycle, which may contribute to the development of radiation-induced carcinogenesis in irradiated tissues and organs of the human body [5, 8–10].

МЕТА

Метою роботи було дослідження розподілу радіаційно-індукованих пошкоджень серед хромосом і їх бендів в опромінених in vitro лімфоцитах крові людини та в неопромінених клітинах-свідках.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові 10 волонтерів, які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенами і були залучені до добровільного цитогенетичного обстеження за умов поінформованої згоди. Цільну кров опромінювали в дозах 0,25 і 1,0 Гр на установці РУМ-17 (потужність дози 0,415 Гр/хв). Культивування крові виконували за загальноприйнятим напівмікрометодом D. A. Hungerford [11]. При моделюванні радіаційно-індукованого ефекту свідка використовували змішану культуру з двох різностатевих популяцій лімфоцитів (по 0,3 мл крові донорів чоловічої і жіночої статі), одна з яких була опромінена in vitro, а інша (неопромінена) використовувалась як «свідок» [12].

Препарати фарбували за допомогою GTG методу [13]. Цитогенетичний аналіз проводили під мікроскопами зі збільшенням × 1000. Реєстрували всі аберації хроматидного і хромосомного типів. Пошкоджені хромосоми та точки розривів ідентифікували згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-2013 [14]. Оцінку пошкоджуваності іонізуючим випромінюванням окремих хромосом проводили з використанням стандартних параметрів геному людини [15, 16].

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером та кореляційного аналізу [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Використання GTG забарвлення препаратів метафазних хромосом при їх цитогенетичному аналізі дозволило ідентифікувати 95 розривів хромосом в 1248 опромінених *in vitro* в дозі 0,25 Гр лімфоцитах периферичної крові людини та 227 розривів хромосом в 726 клітинах при опроміненні в дозі 1 Гр (7,61±0,75 і 31,27±1,72 пошкодження на 100 клітин, відповідно), що перевищило показник контролю ($p < 0,001$) (табл. 1).

При моделюванні радіаційно-індукованого ефекту свідка частоти зареєстрованих пошкоджень хромосом у неопромінених клітинах-свідках при культивуванні в змішаних культурах з опроміненими в дозах 0,25 і 1 Гр лімфоцитами (3,87±0,57 і 4,16±0,55 на 100

OBJECTIVE

The aim of our study was the research the distribution of radiation-induced damages among chromosomes and their bands in irradiated in vitro human blood lymphocytes and in unirradiated bystander cells.

MATERIALS AND METHODS

Research materials were peripheral blood lymphocytes of 10 volunteers who denied conscious contact with ionizing radiation and other mutagens and were involved in voluntary cytogenetic examination under conditions of informed consent. Whole blood was irradiated in vitro in doses 0.25 and 1.0 Gy by X-ray apparatus RUM-17 (dose rate 0.415 Gy/min). Cultivation was performed by accepted semi-micromethod of D. A. Hungerford [11]. For the modeling of radiation-induced bystander effect used mixed culture consisted of two heterosexual populations of lymphocytes (0.3 ml of blood donors both male and female), one of which was irradiated in vitro, and the other (non-irradiated) used as a «bystander» [12].

Slides were stained using GTG-method [13]. Cytogenetic analysis was carried out under the microscopes with increase × 1000. Chromosome and chromatid types of all aberrations were registered. Damaged chromosomes and break points were identified in accordance with the international nomenclature ISCN-2013 [14]. Assessment of damageability by ionizing radiation of individual chromosomes was carried out using standard parameters of the human genome [15, 16].

The data obtained worked out using the method of comparison the mean values for Student's and of correlation analysis [17].

RESULTS AND DISCUSSION

Usage the GTG-staining of metaphase chromosomes' slides under their cytogenetic analysis allowed to identify 95 chromosome breaks in 1248 exposed *in vitro* in dose 0.25 Gy human peripheral blood lymphocytes and 227 chromosome breaks in 726 cells irradiated in dose 1.0 Gy (7.61 ± 0,75 and 31.27 ± 1,72 damages per 100 cells, respectively), which exceeded the control values ($p < 0.001$) (Table. 1).

Under the simulation of radiation-induced bystander effect the frequencies of chromosomes' damages in non-irradiated bystander cells cocultivated jointly with lymphocytes irradiated in doses 0.25 and 1.0 Gy (3.87 ± 0.57 and 4.16 ± 0.55 per 100

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016. Вип. 21.

Таблиця 1
Частота пошкоджених бендів і розривів хромосом

Table 1
Frequency of damaged bands and chromosome breaks

Показники / Key figures	Варіанти досліду				
	Контроль	клітини-свідки / bystander cells		опромінені клітини / irradiated cells	
	Control	0,25 Gy	1,00 Gy	0,25 Gy	1,00 Gy
Кількість проаналізованих метафаз	1395	1137	1321	1248	726
Кількість пошкоджених бендів:					
- абсолютна	31	44	55	72	141
- на 100 метафаз, (M±m)	2,22 ± 0,39	3,87 ± 0,57*	4,16 ± 0,55*	5,77 ± 0,66*	19,42 ± 1,47*
Кількість точок розривів:					
- абсолютна	36	51	75	95	227
- на 100 метафаз, (M±m)	2,58 ± 0,42	4,49 ± 0,61*	5,68 ± 0,64*	7,61 ± 0,75*	31,27 ± 1,72*
- на пошкоджений бенд, (M±m)	1,16 ± 0,29	1,16 ± 0,32	1,36 ± 0,32	1,32 ± 0,32	1,61±0,47

Примітка. * – статистично достовірна різниця з контролем зі ступенем достовірності не більше 0,05 ($p < 0,05 – p < 0,001$).
Note. * – statistically significant difference from the control with the degree of reliability no more than 0.05 ($p < 0.05 – p < 0,001$).

клітин, відповідно) істотно не розрізнялись між собою ($p > 0,05$), проте достовірно перевищували рівень, отриманий при аналізі неопромінених клітин, зі ступенями достовірності $p < 0,01$ і $p < 0,001$, відповідно. В усіх варіантах досліду зареєстровані локуси хромосом, в яких локалізувалось більше одного розриву, внаслідок чого середня частота розривів на пошкоджений бенд перевищувала 1.

Аналіз розподілу точок розривів хромосом при формуванні аберацій показав, що в опромінених in vitro в дозах 0,25 і 1,00 Гр клітинах та клітинах-свідках при їх культивуванні з опроміненими в дозі 1,00 Гр лімфоцитами, хромосоми пошкоджувались відповідно до їх відносної довжини. Це підтверджено результатами кореляційного аналізу, який показав існування прямого, сильного, достовірного зв'язку між зареєстрованою та очікуваною (з урахуванням відносної довжини) частотою пошкоджень хромосом (табл. 2). У клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозі 0,25 Гр, між зареєстрованою та очікуваною кількістю пошкоджень хромосом встановлено прямий достовірний зв'язок середньої сили, що, на нашу думку, зумовлено тим, що в цьому варіанті досліду лише у 50 % обстежених осіб виявлено ефект свідка.

Отримані дані щодо пошкоджуваності іонізуючим випромінюванням хромосом узгоджуються з результатами досліджень K. Ohtaki, де в осіб, які пережили атомне бомбардування в Хіросімі, виявлена лінійна залежність участі хромосом у формуванні стабільних аберацій від відносного вмісту ДНК ($r = 0,92$), тобто,

cells, respectively) did not significantly differ among themselves ($p > 0.05$), but was significantly higher than the level obtained at the analysis of non-irradiated cells, with degrees of reliability $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. In all variants of the research were registered the chromosomes' loci, in which localized more than one break, resulting the mean frequency of breaks per damaged band exceeded 1.

The analysis of distribution the break points in chromosomes during the formation of aberrations showed that in cells irradiated in vitro in doses of 0.25 and 1.00 Gy and in bystander cells jointly cocultivated with lymphocytes irradiated in dose 1.00 Gy chromosomes were damaged according to their relative length. This was confirmed by results of correlation analysis, which revealed the existence of a direct, strong, reliable connection between observed and expected (considering the relative length) frequency of chromosome damage (Table 2). In bystander cells incubated in mixed cultures with lymphocytes exposed in dose 0.25 Gy between registered and expected number of chromosome damages direct reliable connection of mean strength was established, which, in our opinion, due to the fact that in this variant of the experiment only in 50 % of surveyed persons bystander effect was registered.

The data obtained agree with the results of research K. Ohtaki where in persons survived the atomic bombing of Hirosima was revealed linear dependence of chromosomes' participate in the formation of stable aberrations on the relative content of DNA ($r = 0.92$), ie practically from chromosome

Таблиця 2

Величина коефіцієнта кореляції між очікуваною з урахуванням відносної довжини та зареєстрованою частотою пошкоджень

Table 2

The value of the correlation coefficient between expected considering the relative length and registered frequency of damages

Варіанти досліду / variants of experiment	R xy
Клітини-свідки, 0,25 Гр / bystander cells 0.25 Gy	0,51
Клітини-свідки, 1,00 Гр / bystander cells 1 Gy	0,83
Опромінені клітини, 0,25 Гр / irradiated cells 0.25 Gy	0,89
Опромінені клітини, 1,00 Гр / irradiated cells 1 Gy	0,86

практично від довжини хромосоми [18]. Разом з тим, S. Knehr зі співавторами показали неоднакову ймовірність участі різних хромосом в радіаційно індукованих перебудовах, що на думку авторів, може бути пов'язано зі структурою хромосом [19]. Хромосоми з високим вмістом ДНК (1-7) рідше брали участь в обмінних пошкодженнях, і навпаки, хромосоми з меншим вмістом ДНК (X-14) частіше входили до аберацій, ніж цього очікували, базуючись на їх довжині. Варто зауважити, що дані щодо пошкоджуваності окремих хромосом при індукції ефекту свідка в літературі відсутні.

В наших дослідженнях також виявлено більше чи менше пошкодження деяких хромосом порівняно з очікуваним показником, що базувався на їх відносній довжині. Так, хромосома 17 (при опроміненні 1 Гр); 1, 2 (при опроміненні 0,25 Гр) 3, 7, 13, 16 (в клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозі 0,25 Гр), 4, 5 (в клітинах-свідках при культивуванні з лімфоцитами, опроміненими в дозі 1 Гр) пошкоджувались частіше. Як у варіантах досліду з опроміненням, так і в клітинах-свідках і контролі, жодного разу не реєстрували розривів Y-хромосоми. Відсутність індукованих радіацією розривів в Y хромосомі спостерігали також M. Bauchinger [20] і K. Buckton [21] в дослідах *in vitro* після дії на культуру лімфоцитів периферичної крові людини рентгенівських променів.

Аналіз пошкоджуваності окремих локусів хромосом дозволив виділити бенди, що частіше пошкоджувались безпосередньо іонізуючим випромінюванням і внаслідок індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах при культивуванні з опроміненими клітинами (табл. 3). Підвищена радіочутливість деяких з них вже відмічена нами раніше, а також зареєстрована іншими авторами. Так, більше пошкодження бенду 1q21 зареєстровано нами у працівників Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС), які

length [18]. However, S. Knehr et al. showed unequal probability of participation various chromosomes in radiation-induced rearrangements that according to the authors may be associated with structure of chromosomes [19]. Chromosomes with a high content of DNA (1-7) rarely participated in the exchange injuries, and vice versa, chromosomes with lower content of DNA (X-14) more frequently took part in forming of aberrations than it expected based on their length. It should be noted that data on individual chromosome damages at the induction of bystander effect absent in the literature.

In our studies more or less damage of some chromosomes compared to the expected based on their relative length also was found. Thus, chromosome 17 (in cells irradiated in dose 1.0 Gy); 1, 2 (in cells irradiated in dose 0.25 Gy), 3, 7, 13, 16 (in bystander cells cultured with lymphocytes exposed in dose 0.25 Gy), 4, 5 (in bystander cells cultured with lymphocytes exposed in dose 1.0 Gy) more often damaged. As in all variants of experiments with irradiation as in bystander cells and in control never observed breaks in Y-chromosome. The absence of radiation induced breaks in Y-chromosome also observed M. Bauchinger [20] and K. Buckton [21] in the experiments *in vitro* after X-ray exposure the culture of human peripheral blood lymphocytes.

Analysis the damageability of individual chromosome loci allowed to select the bands that more often damaged as directly by ionizing radiation as because the induction of bystander effect in non-irradiated lymphocytes cultured with irradiated cells (Table 3). Increased radiosensitivity some of them was already found by us earlier and was registered by other authors. Thus, the more damage of band 1q21 was registered by us in personnel of Chornobyl Nuclear Power Plant (NPP) exposed to low doses of ionizing

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016. Вип. 21.

Таблиця 3
Локуси, в яких зареєстровано найбільша кількість пошкоджень хромосом

Table 3
Loci, in which the largest number of chromosome damages was registered

Варіанти досліду / variants of experiment	Локуси / loci
Клітини-свідки, 0,25 Гр / bystander cells, 0.25 Gy	3q21
Клітини-свідки, 1,0 Гр / bystander cells, 1 Gy	3q21; 4q31; 5q31; 11q23
Опромінені клітини, 0,25 Гр / irradiated cells, 0.25 Gy	6q27; 7p15; 8p11; 10p11
Опромінені клітини, 1,0 Гр / irradiated cells, 1 Gy	1p22; 1q21; 2q14; 2q31; 3p21; 5q31;6p21; 6q21;7q22; 8q22; 9p22; 9p13; 9q13; 10p11; 10q21; 11q23; 12q22; 12q24; 13q14; 14q24; 16q22; 17q25; 19p13; 20q13; 22q13

зазнавали дії радіації в малих дозах внаслідок професійної діяльності, у осіб, які перехворіли на гостру променеву хворобу другого ступеня (ГПХ-2) внаслідок опромінення під час ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС [22], а також C. Lee and O. Kamra в дослідах *in vitro* [23], L. Barrios – безпосередньо після сеансів радіотерапії [24] та K. Buckton після опромінення хворих на спондиліт [25].

Бенд 7q22 зареєстрований нами серед найбільш пошкоджуваних радіацією у осіб, які перехворіли на гостру променеву хворобу першого ступеня (ГПХ-1) [22], а також в дослідженнях M. Bauchinger et al., L. Barrios et al., K. Buckton et al., Y. Kano et al. [20, 24-26]. Бенд 3p21, як встановлено в наших попередніх дослідженнях, частіше пошкоджувався у осіб, які перехворіли на гостру променеву хворобу [22].

Загалом, аналіз місць локалізації найбільш пошкоджуваних смуг хромосом показав, що як у опромінених клітинах, так і в клітинах-свідках їх розташування найчастіше співпадало з «гарячими точками» пошкоджуваності хромосом при опроміненні та фрагільними сайтами [27].

Визначення питомої ваги еухроматинових та гетерохроматинових бендів серед загальної кількості зареєстрованих пошкоджень хромосом показало, що у всіх обстежених групах більш чутливими до дії радіації були еухроматинові райони хромосом (табл. 4). Такий розподіл радіаційно-індукованих пошкоджень узгоджується як з раніше проведеними нами дослідженнями, так і з даними M. Bauchinger та L. Barrios зі співавторами [20, 24]. Беручи до уваги, що від 53 до 61 % довжини геному є G-негативним [23, 28], можна вважати, що еухроматинові райони частіше пошкоджуються як в неопроміненому організмі, так і під час дії радіації.

Аналіз розподілу зареєстрованих в дослідженнях пошкоджень вздовж хромосом показав, що в опромінених в дозі 1 Гр клітинах та клітинах-свідках при опроміненні 1 Гр частка зареєстрованих в центр-

radiation as a result of their professional activity and in persons recovered from acute radiation sickness second degree of severity (ARS-2) due to irradiation under liquidation the consequences of Chornobyl disaster [22] and also by C. Lee and O. Kamra in the *in vitro* studies [23], L. Barrios – immediately after radiotherapy session [24] and K. Buckton after irradiation of patients with spondylitis [25].

Band 7q22 was detected by us among the most damaged loci in people recovered from acute radiation sickness first degree of severity (ARS-1) [22] and in M. Bauchinger et al., L. Barrios et al., K. Buckton et al., Y. Kano et al. studies [20, 24-26]. Band 3p21 as was shown in our previous studies more often damaged in patients recovered from acute radiation sickness [22].

Overall, the analysis of localization the most damaged chromosome bands showed that in both the irradiated cells and bystander cells their location often coincided with the «hot spots» of chromosome injury following irradiation and with fragile sites [27].

Determination the proportion of euchromatin and heterochromatin bends among the total number of registered chromosome damages showed that in all examined groups more sensitive to the radiation exposure were euchromatin regions of chromosomes (Table 4). Such distribution of radiation-induced damages agreed both with previously conducted our studies and with the data received by M. Bauchinger and L. Barrios et al. [20, 24]. Considering that from 53 to 61 % of the genome length is G-negative [23, 28], we can assume that euchromatin areas often damaged as in non-irradiated as in radiation-exposed organism.

Analysis the distribution of detected damages along chromosomes showed that in directly exposed in dose 1.0 Gy cells and in bystander cells at the same dose the proportion of breaks registered in the

Таблиця 4

Частка еухроматинових та гетерохроматинових бендів серед загальної кількості зареєстрованих пошкоджень хромосом

Table 4

The proportion of euchromatin and heterochromatin bands among the total number of registered chromosome damages

Варіанти досліду Variants of experiment	Еухроматинові бенди, % Euchromatin bands, %	Гетерохроматинові бенди, % Heterochromatin bands, %
Контроль / control	83	17
Клітини-свідки, 0,25 Гр / bystander cells, 0.25 Gy	86	14
Клітини-свідки, 1,0 Гр / bystander cells, 1.0 Gy	88	12
Опромінені клітини, 0,25 Гр / bystander cells, 0.25 Gy	86	14
Опромінені клітини, 1,0 Гр / bystander cells, 1.0 Gy	82	18

ромерних районах хромосом (p11-cen-q11) розривів була меншою, ніж в контролі ($p < 0.05$) (табл. 5).

Отримані дані узгоджуються з результатами наших попередніх досліджень, коли в осіб, які зазнали опромінення у високих дозах та перехворіли на ГПХ, відсоток зареєстрованих в центромерних районах хромосом розривів був меншим, ніж в контрольній групі ($p < 0.05$) [22] та співставні з даними M. Bauchinger та K. Buckton, які встановили, що кількість локалізованих у центромерному районі пошкоджень при опроміненні in vitro становила 8 та 10 %, відповідно [20, 21].

Пошкодження термінальних бендів в опромінених клітинах не мало статистично достовірної різниці з контрольними показниками ($p > 0.05$). Оскільки теломери відіграють значну роль в стабілізації хромосом [29, 30], зареєстрований результат свідчить про стабільність геному обстежених нами осіб. Заслуговує на увагу і той факт, що пошкоджуваність термінальних бендів у клітинах свідках була нижчою, ніж в контролі ($p < 0.05$), що, можливо, може бути наслідком певної стимуляції процесів репарації в теломерних районах хромосом при розвитку ефек-

centromeric regions of chromosomes (p11-cen-q11) was lower than in control ($p < 0.05$) (Table 5).

The data received consistent with the results of our previous studies, when in persons exposed to high radiation doses and recovered from ARS the percentage of chromosome breaks registered in the centromeric regions was lower than in the control group ($p < 0.05$) [22] and are comparable to data of M. Bauchinger and K. Buckton which established that number of localized damages in centromeric region under irradiation in vitro was 8 and 10 %, respectively [20, 21].

Damages in terminal bands of irradiated cells had no statistically significant difference with control parameters ($p > 0.05$). Because telomeres play an important role in chromosomes' stabilizing [29, 30], the results received testifies stability the genome of examined individuals. Noteworthy is the fact that vulnarability of terminal bands in bystander cells was lower than in control ($p < 0.05$), which may be the result the stimulation of repair processes in the telomeric regions of chromosomes at the development of bystander effect

Таблиця 5

Частка розривів, що локалізувались в центромерних районах та термінальних бендах, від загальної кількості зареєстрованих пошкоджень хромосом

Table 5

The proportion of breaks that localized in centromeric regions and terminal bands from the total number of registered chromosome damages

Варіанти досліду Variants of experiment	Центромерні райони хромосом, % Centromeric regions, %	Термінальні бенди, % Terminal bands, %
Контроль / control	11,1	33,3
Клітини-свідки, 0,25 Гр / bystander cells, 0.25 Gy	12,0	28,0
Клітини-свідки, 1,0 Гр / bystander cells, 1 Gy	5,3	28,0
Опромінені клітини, 0,25 Гр / irradiated cells, 0.25 Gy	9,5	31,0
Опромінені клітини, 1,0 Гр / irradiated cells, 1 Gy	7,1	32,2

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016. Вип. 21.

ту свідка, спрямованої на захист цілісності і стабільності геному клітин.

ВИСНОВОК

Таким чином, проведений аналіз розподілу індукованих радіацією розривів серед хромосом та їх бендів показав, що в опромінених клітинах та клітинах-свідках частота пошкоджених бендів та кількість розривів, які локалізувались в них, перевищувала контрольну. Хромосоми пошкоджувались відповідно до їх відносної довжини. Разом з тим, у всіх варіантах досліду зустрічались хромосоми та бенди, що були пошкоджені частіше. Аналіз місць локалізації найбільш пошкоджуваних смуг хромосом показав, що як в опромінених клітинах, так і в клітинах-свідках їх розташування частіше співпадало з «гарячими точками» пошкоджуваності хромосом при опроміненні та фрагільними сайтами. Більш чутливими до іонізуючого випромінювання були G-негативні бенди хромосом. Пошкоджуваність термінальних бендів в опромінених клітинах не мала достовірної різниці з контролем, а у клітинах свідках була нижчою від контрольної ($p < 0.05$).

aimed at protect the integrity and stability of the cells' genome.

CONCLUSION

Thus, analysis the distribution of radiation induced breaks between chromosomes and their bands showed that both in directly irradiated cells and in bystander cells the frequency of damaged bands and number of breaks, which localized in them exceeded control values. Chromosomes were damaged according to their relative lengths. However, in all variants of the experiment encountered certain chromosomes and their bands that more often damaged. Analysis the places of localization the most damaged chromosome bands showed that location of bands with increasing number of breaks often coincided with the «hot spots» of chromosome damages following radiation exposure and with fragile sites. More sensitive to irradiation were G-negative euchromatin chromosome bands, in which were localized 82–88 % breaks. Damageability of telomeric regions in the irradiated cells had no significant difference from the control, while in bystander cells was even lower than control values ($p < 0.05$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random / K. L. Johnson, D. J. Brenner, J. Nath et al. // Int. J. Radiat. Biol. - 1999. - Vol. 75, no. 2. - P. 131-141.

2. Chromosome breakpoint distribution of damage induced in peripheral blood lymphocytes by densely ionizing radiation / R. M. Anderson, N. D. Sumption, D. G. Papworth, D. T. Goodhead // Int. J. Radiat. Biol. - 2006. - Vol. 82, no. 1.- P. 49-58.

3. Murugesan R. Radiation-induced chromosomal hot spots at G1 and G2 stages of human lymphocytes in culture // Indian J. Hum. Genet. - 2003. - Vol. 9, no. 1.- P. 21-24.

4. Wright E. G. Commentary on radiation-induced bystander effects / E. G. Wright // Hum. Exp. Toxicol. - 2004. - Vol. 23, no. 2. - P. 91-94.

5. Wright E. Mechanisms of non- targeted effects (14 червня) 2010 [Electronic resource] / E. Wright. - Available from : https://www.note-ip.org/Meetings_and_events/ NOTE_ Workshops.

6. Шеметун О. В. Дослідження модифікації ефекту свідка, індукованого рентгенівським випромінюванням в умовах in vitro / О. В. Шеметун, О. О. Талан // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. - 2014. - Вип. 19. - С. 371-376.

7. Azzam E. I. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect / E. I. Azzam, S. M. de Toledo, J. B. Little // Oncogene. - 2003. - Vol. 22. - P. 7050-7057.

8. Shemetun O. V. Cytogenetic peculiarities of induction and persistence the bystander effect in human blood lymphocytes / O. V. Shemetun, O. O. Talan, M. A. Pilinska // Tsitol. Genet. - 2014. - Vol. 48 (4). - P. 51-58.

REFERENCES

1. Johnson KL, Brenner DJ, Nath J, et al. Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random. Int J Radiat Biol. 1999;75(2):131-41.

2. Anderson RM, Sumption ND, Papworth DG, Goodhead DT. Chromosome breakpoint distribution of damage induced in peripheral blood lymphocytes by densely ionizing radiation. Int J Radiat Biol. 2006;82(1):49-58.

3. Murugesan R. Radiation-induced chromosomal hot spots at G1 and G2 stages of human lymphocytes in culture. Indian J Hum Genet. 2003;9(1):21-4.

4. Wright EG. Commentary on radiation-induced bystander effects. Hum Exp Toxicol. 2004;23(2):91-4.

5. Wright E. Mechanisms of non- targeted effects (14 червня) 2010 [Internet]. Available from: https://www.note-ip.org/Meetings_and_events/ NOTE_ Workshops.

6. Shemetun OV, Talan OO. Investigation of modification X-ray induced bystander effect in vitro. Probl Radiac Med Radiobiol. 2014;19:371-6.

7. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. Oncogene. 2003;22:7050-7.

8. Shemetun OV, Talan OO, Pilinska MA. Cytogenetic peculiarities of induction and persistence the bystander effect in human blood lymphocytes. Tsitol Genet. 2014;48(4):51-8.

9. Nagasawa H. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha- particles / H. Nagasawa, J. B. Little // Cancer Res. - 1992. - Vol. 52. - P. 6394-6396.

10. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models / O. A. Sedelnikova [et al.] // Cancer Res. - 2007. - Vol. 67, no. 9. - P. 1-8.

11. Hungerford D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whool blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL / D. A. Hungerford // Stain Technol. - 1965. - Vol. 40, no. 6. - P. 333-338.

12. 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 // Журнал АМН України. - 2006. - Т. 12, № 3. - С. 556-565.

13. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини : методичні рекомендації / КМАПО МОЗ України. - Київ, 2003. - 23 с.

14. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. - Basel : Karger, 2013. - 140 p.

15. Хромосомы человека : атлас / А. Ф. Захаров, В. А. Бенюш, Н. П. Кулешов, Л. И. Барановская. - М. : Медицина , 1982. -263 с.

16. Morton N. E. Parameters of the human genome / N. E. Morton // Proceeding of the National Academy of Scinces USA. - 1991. - Vol. 88. - P. 7474-7476.

17. Атраментова Л. А. Статистические методы в биологии / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. - Горловка : Ліхтар, 2008. - 248 с.

18. Ohtaki K. G-banding analysis of radiation-induced chromosome damage in lymphocytes of Hiroshima A-bomb survivors / K. Ohtaki // Jpn. J. Hum. Genet.- 1992.- Vol. 37. - P. 245-262.

19. Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations / S. Knehr, H. Zitzelsberger, H. Braselmann [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. - 1996. - Vol. 70, no. 4. - P. 385-392.

20. Bauchinger M. Distribution of radiation lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding / M. Bauchinger, G. Gotz // Radiat. Environm. Biophys. -1979. - Vol. 16. - P. 355-366.

21. Buckton K. E. Identification with G and R banding of breakage points in human chromosomes by in vitro X-irradiation / K. E. Buckton // Int. J. Radiat. Biol. - 1976. - Vol. 29, no. 5. - P. 475-488.

22. Shemetun O. V. The distribution of radiation-induced breaks in the chromosomes of irradiated subjects / O. V. Shemetun, M. A. Pilins'ka, H. M. Shemetun // Tsitol. Genet. - 2000. - Vol. 34 (4). - P. 10-15.

23. Lee C. L. Y. The pattern of radiation-induced transmissible aberrations in a human cell culture / C. L. Y. Lee, Kamra O. // Hum. Genet. - 1981. - Vol. 57. - P. 380-384.

24. Barrios L. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations / L. Barrios, R. Miro, M. R. Caballin // Cancer Genet. - 1989. - Vol. 41. - P. 61-70.

25. Buckton K. E. Chromosome aberrations in pations treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis / K. E. Buckton // Radiation-induced chro-

9. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. Cancer Res. 1992;52:6394-6.

10. Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA, et al. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. Cancer Res. 2007;67(9):1-8.

11. Hungerford DA. Leukocytes cultured from small inocula of whool blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL. Stain Technol. 1965;40(6):333-8.

12. 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.

13. Kyivska medychna akademiia pisliadyplomnoi osvity Ministry of Health of Ukraine. [Cytogenetic methods of investigation of human chromosomes: methodic recommendations]. Kyiv; 2003. 23 p. Ukrainian.

14. Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2013). Basel: Karger; 2013. 140 p.

15. Zakharov AF, Benyush VA, Kuleshov NP, Baranovskaya LI. [Human chromosomes: atlas]. Moscow: Meditsina; 1982. 263 p. Russian.

16. Morton NE. Parameters of the human genome. Proceeding of the National Academy of Scinces USA. 1991;88:7474-6.

17. Atramentova LA, Utevskaya AM. [Statistical methods in biology]. Horlovka: Likhtar; 2008. 248 p. Russian.

18. Ohtaki K. G-banding analysis of radiation-induced chromosome damage in lymphocytes of Hiroshima A-bomb survivors. Jpn J Hum Genet. 1992;37:245-62.

19. Knehr S, Zitzelsberger H, Braselmann H, Nahrstedt U, Bauchinger M. Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. Int J Radiat Biol. 1996;70(4):385-92.

20. Bauchinger M, Gotz G. Distribution of radiation lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding. Radiat Environm Biophys. 1979;16(4):355-66.

21. Buckton KE. Identification with G and R banding of breakage points in human chromosomes by in vitro X-irradiation. Int J Radiat Biol. 1976;29(5):475-88.

22. Shemetun OV, Pilins'ka MA, Shemetun HM. The distribution of radiation-induced breaks in the chromosomes of irradiated subjects. Tsitol Genet. 2000;34(4):10-5.

23. Lee CLY, Kamra O. The pattern of radiation-induced transmissible aberrations in a human cell culture. Hum Genet. 1981;57:380-4.

24. Barrios L, Miro R, Caballin MR. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. Cancer Genet. 1989;41:61-70.

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016. Вип. 21.

mosome damage in man / ed. by T. Ishihara, M. S. Sasaki. - New York : Liss, 1983. - P. 491-511.

26. Kano Y. Site-specific chromosomal rearrangements induced in human diploid cells by X-irradiation / Y. Kano, J. B. Little // Cytogenet. Cell Genet. - 1986. - Vol. 41. - P. 22-29.

27. Kimio Tanaka. Distribution of breakpoints on chromatid-type aberration induced by three different radiations, in relation to fragile sites / Kimio Tanaka, Nanao Kamada // Indian J. Sci. Technol. - 2009. - Vol. 2, no. 9. - P. 1-9.

28. Non-random distribution of chromosome breaks in lymphocytes of atomic bomb survivors / K. Tanaka, M. Kamada, T. Ohkita, A. Kuramoto / J. Radiat. Res. - 1983. - Vol. 24. - P. 291-304.

29. Day J. P. Telomeres and their possible role in chromosome stabilization / J. P. Day, B. A. Marder, W. F Morgan // Enviromen Mol Mugen. - 1993. - Vol. 22, no. 4. - P. 245-249.

30. Meltzer P. S. Telomere capture stabilized chromosome breakage / P. S. Meltzer, X. Y. Guan, J. M. Trent // Nature genetics. - 1993. - Vol. 4, no. 3. - P. 252-255.

25. Buckton KE. Chromosome aberrations in pations treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis. In: Ishihara T, Sasaki MS, editors. Radiation-induced chromosome damage in man. New York: Liss; 1983. p. 491-511.

26. Kano Y, Little JB. Site-specific chromosomal rearrangements induced in human diploid cells by X-irradiation. Cytogenet Cell Genet. 1986;41:22-9.

27. Tanaka Kimio, Kamada Nanao. Distribution of breakpoints on chromatid-type aberration induced by three different radiations, in relation to fragile sites. Indian J Sci Technol. 2009;2(9):1-9.

28. Tanaka K, Kamada M, Ohkita T, Kuramoto A. Non-random distribution of chromosome breaks in lymphocytes of atomic bomb survivors. J Radiat Res. 1983;24:291-304.

29. Day JP, Marder BA, Morgan WF. Telomeres and their possible role in chromosome stabilization. Environ Mol Mugen. 1993;22(4):245-9.

30. Meltzer PS, Guan XY, Trent JM. Telomere capture stabilized chromosome breakage. Nature genetics. 1993;4(3):252-5.

Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim Biophys Acta. 2001;1512:251-8.

Стаття надійшла до редакції 02.08.2016 *Received: 02.08.2016*