

О. В. Шеметун

Модифікація радіаційно-індукованого цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферичної крові людини з використанням антиоксидантного вітамінного препарату

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

*Досліджено цитогенетичний ефект в опромінених *in vitro* в дозі 1 Гр лімфоцитах периферичної крові людини при окремому культивуванні та при дії антиоксидантного вітамінного препарату “Веторон” (містить вітаміни А, Е, С) в концентрації 40 мкг/мл. Встановлено, що застосування антиоксидантного вітамінного препарату перед опроміненням крові забезпечує зниження радіаційно-індукованої частоти аберацій хромосом в середньому на 49,55%.*

Широке використання атомної енергії може призвести до додаткового опромінення людини, особливо в аварійних ситуаціях, насамперед персоналу, зайнятого у відповідних технологічних циклах, і населення, яке проживає на забруднених радіонуклідами територіях. Тому дослідниками проводиться активна експериментальна робота з пошуку, випробування та впровадження засобів, що мають радіопротекторні властивості. При цьому велика увага приділяється вивченню антиоксидантів [1, 2]. Вітаміни, що належать до природних антиоксидантів (токоферол, ретинол і каротиноїди, аскорбінова кислота), сприяють нейтралізації вільних радикалів і припиненню ланцюгових реакцій пероксидного окиснення в тканинах, захищаючи клітини при дії іонізуючої радіації [3].

Метою дослідження було встановлення частоти всіх типів аберацій хромосом в опромінених *in vitro* лімфоцитах периферичної крові людини при дії антиоксидантного вітамінного препарату в концентрації, що модифікує радіаційно-індукований цитогенетичний ефект і має радіопротекторні властивості.

При виконанні роботи використовували антиоксидантний препарат “Веторон” (Росія), що містить водорозчинні форми вітамінів Е (токоферолу) і С (аскорбінової кислоти) у концентрації 40 мг/мл та А (ретинолу) у концентрації 20 мг/мл. “Веторон” застосовували в концентрації 40 мкг/мл, яка за результатами попереднього пошукового експерименту не справляла токсичного впливу на культуру лімфоцитів периферичної крові людини і виявляла найкращий антиоксидантний ефект при опроміненні цільної крові *in vitro* [4, 5].

Опромінення крові в дозі 1 Гр проводили на установці РУМ-17 (напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм + Al 1 мм, фокусна відстань 50 см, потужність дози 0,415 Гр/хв).

Матеріалом цитогенетичного дослідження були лімфоцити периферичної крові 10 умовно здорових волонтерів середнього віку. Дослідження виконували за загальноприйнятим напівмікрометодом [6]. Диференційне G-забарвлення метафазних хромосом проводили з використанням трипсину [6]. Аналіз здійснювали під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Реєстрували всі аберації хроматидного і хромосомного типів. Пошкоджені хромосоми та

точки розривів аналізували згідно з міжнародною номенклатурою ISCN-2005 [7]. Загалом проаналізовано 6251 G-диференційно забарвлених метафаз: 2629 неопромінених клітин для встановлення умовно контрольного рівня аберацій хромосом, 1521 клітину при опроміненні крові *in vitro* в дозі 1 Гр та 2101 клітину з додаванням перед опроміненням крові препарату “Веторон”. Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Стьюдентом–Фішером [8].

Цитогенетичний аналіз показав, що середній рівень аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові обстежених осіб становив $1,90 \pm 0,27$ на 100 клітин (табл. 1), що відповідає популяційному рівню пошкоджень хромосом [9].

При опроміненні крові *in vitro* в дозі 1 Гр середня частота абераційних клітин становила $(21,30 \pm 1,05)\%$. Зареєстровано клітини з двома пошкодженнями хромосом, внаслідок чого рівень аберацій хромосом становив $24,19 \pm 1,10$ на 100 клітин і статистично достовірно перевищував показники неопроміненого контролю ($p < 0,001$).

Варто зазначити, що рівень радіаційно-індукованих аберацій у нашому дослідженні узгоджувався з оптимальною частотою пошкоджень (близько 20%), рекомендованою для експериментального виявлення хімічних модифікаторів мутагенезу [10], що підтверджує правильність величини дози опромінення, вибраної для проведення досліджень.

Застосування перед опроміненням крові антиоксидантного препарату “Веторон” у дозі 40 мкг/мл спричинило статистично значуще зниження середнього рівня аберацій хромосом до $12,23 \pm 0,71$ на 100 метафаз ($p < 0,001$), що свідчить про антиоксидантні властивості препарату і на підставі чого його можна віднести до антимутагенів “середньої” ефективності, для яких притаманно зменшення частоти аберацій на 40,1–80% [11].

Отримані нами результати зіставні з даними М. Копораска, згідно з якими вітаміни С і Е (“Sigma”) при окремому використанні можуть спричиняти антиоксидантний ефект в культурі опромінених лімфоцитів крові людини при додаванні *in vitro* у концентрації 10 мкг/мл [12].

Аналіз спектра зареєстрованих пошкоджень хромосом показав, що при дії випромінювання аберації хроматидного типу були представлені хроматидними розривами і обмінами з середньою частотою $2,56 \pm 0,41$ на 100 метафаз, яка перевищувала відповідний показник у контролі ($p < 0,05$) (табл. 2).

При застосуванні препарату “Веторон” хроматидних обмінів не зареєстровано, а частота хроматидних розривів знизилась до $0,95 \pm 0,21$ на 100 метафаз і не мала різниці з неопроміненим контролем ($p > 0,05$). Беручи до уваги те, що індукція аберацій хроматидного типу не притаманна для дії іонізуючого випромінювання в нестимульованих лімфоцитах людини і є характерною ознакою хромосомної нестабільності, ми вважаємо, що зареєстрована в дослідженні підвищена частота хроматидних пошкоджень може бути спричинена індукцією

Таблиця 1. Основні цитогенетичні показники в опромінених *in vitro* лімфоцитах периферичної крові при окремому культивуванні та дії антиоксидантного препарату “Веторон”

Варіант дослідю	Частота абераційних клітин, %	Рівень аберацій хромосом, на 100 клітин	
		середній	мінімальний — максимальний
Контроль	$1,90 \pm 0,27$	$1,90 \pm 0,27$	0,96–3,50
Опромінення, 1 Гр	$21,30 \pm 1,05$	$24,19 \pm 1,10$	17,60–31,30
“Веторон”, 40 мкг/мл + опромінення, 1 Гр	$11,19 \pm 0,69$	$12,23 \pm 0,71$	9,69–15,12

bystander effect (вторинними змінами в неопромінених клітинах) [13], а її зниження при додаванні антиоксидантного препарату свідчить про визначальну роль оксидативного стресу в механізмі розвитку радіаційно-індукованого ефекту свідка.

Переважну більшість (89%) серед зареєстрованих пошкоджень в опромінених лімфоцитах становили аберації хромосомного типу, що характерно для впливу іонізуючої радіації в G₀ стадії клітинного циклу [14]. Застосування “Веторону” спричинило статистично достовірне зниження індукованих іонізуючим випромінюванням пошкоджень хромосомного типу до рівня $11,28 \pm 0,69$ на 100 метафаз зі ступенем достовірності $p < 0,001$ (табл. 3). Проте навіть після використання антиоксидантного препарату рівень аберацій хромосомного типу в опромінених лімфоцитах статистично вірогідно перевищував контрольний показник ($p < 0,001$).

Радіаційно-індукований рівень делецій хромосом становив $7,82 \pm 0,69$ на 100 метафаз (див. табл. 3). Застосування “Веторону” сприяло зниженню частоти делецій до $4,66 \pm 0,46$ на 100 клітин ($p < 0,05$).

Частота асиметричних хромосомних обмінів (дицентричних та центричних кільцевих хромосом), які є нестабільними маркерами дії радіації, при опроміненні перевищувала контрольний рівень і становила $8,42 \pm 0,71$ на 100 метафаз. Використання антиоксиданту забезпечило статистично достовірне зниження частоти асиметричних хромосомних обмінів до $3,62 \pm 0,41$ на 100 метафаз ($p < 0,001$).

Частота симетричних хромосомних обмінів (транслокацій та інверсій) в опромінених *in vitro* в дозі 1 Гр лімфоцитах периферичної крові становила $5,39 \pm 0,58$ на 100 клітин. При застосуванні антиоксидантного препарату встановлено статистично вірогідне її зниження ($p < 0,02$), що підтверджує радіопротекторні властивості “Веторону”.

Аналіз індивідуальних цитогенетичних показників волонтерів виявив різну радіочутливість лімфоцитів периферичної крові окремих осіб до опромінення у високій дозі. Радіаційно-індуковані частоти аберацій хромосом були максимальними в культурах лімфоцитів № 4 і № 6, а мінімальними — в культурах № 5 і № 8 (табл. 4).

Таблиця 2. Частота аберацій хроматидного типу в опромінених *in vitro* лімфоцитах периферичної крові при окремому культивуванні та дії антиоксидантного препарату “Веторон”

Варіант досліджу	Частота аберацій, на 100 клітин		
	хроматидних розривів	хроматидних обмінів	всього
Контроль	$0,80 \pm 0,17$	$0,00 \pm 0,00$	$0,80 \pm 0,17$
Опромінення, 1 Гр	$2,43 \pm 0,40$	$0,13 \pm 0,09$	$2,56 \pm 0,41$
“Веторон”, 40 мкг/мл + опромінення, 1 Гр	$0,95 \pm 0,21$	$0,00 \pm 0,00$	$0,95 \pm 0,21$

Таблиця 3. Частота аберацій хромосомного типу в опромінених *in vitro* лімфоцитах периферичної крові при окремому культивуванні та дії антиоксидантного препарату “Веторон”

Варіант досліджу	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин			
	делецій	транслокацій і інверсій	дицентриків і кільцевих хромосом	всього
Контроль	$0,84 \pm 0,18$	$0,19 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,20$
Опромінення, 1 Гр	$7,82 \pm 0,69$	$5,39 \pm 0,58$	$8,42 \pm 0,71$	$21,63 \pm 1,06$
“Веторон”, 40 мкг/мл + опромінення, 1 Гр	$4,66 \pm 0,46$	$3,00 \pm 0,37$	$3,62 \pm 0,41$	$11,28 \pm 0,69$

Таблиця 4. Індивідуальні частоти аберацій хромосом у обстежених волонтерів при окремому культивуванні опромінених *in vitro* лімфоцитів периферичної крові та попередній дії антиоксидантного препарату “Веторон”

Культура лімфоцитів, № п/п	Частота аберацій хромосом, на 100 клітин			Зниження радіаційно-індукованої частоти аберацій, %
	Контроль	Опромінення, 1 Гр	“Веторон”, 40 мкг/мл + опромінення, 1 Гр	
1	0,96	24,50	10,66	56,49
2	2,05	26,00	12,09	53,56
3	1,00	24,14	12,50	48,22
4	3,00	28,76	13,62	52,64
5	1,07	17,60	9,69	44,94
6	3,50	31,30	15,12	51,69
7	2,00	25,81	13,37	48,20
8	2,00	18,79	10,22	45,61
9	2,70	24,26	13,03	46,29
10	2,00	21,52	12,30	42,84

Обстежені особи по-різному реагували на введення в кров перед її опроміненням антиоксидантного препарату. Якщо в середньому по групі після введення “Веторону” радіаційно-індукована частота аберацій хромосом знижувалась на 49,55%, то в культурі лімфоцитів № 1 цей показник становив 56,49%, а в культурі № 10 — 42,84%.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено частоту аберантних клітин, рівень та спектр аберацій хромосом в опромінених *in vitro* в дозі 1 Гр лімфоцитах периферичної крові умовно здорових осіб при окремому культивуванні та з попереднім застосуванням антиоксидантного препарату “Веторон” в концентрації 40 мкг/мл. Показано, що застосування “Веторону” в концентрації 40 мкг/мл забезпечує статистично достовірне зниження рівнів усіх типів аберацій хромосом, порівняно з радіаційно-індукованим, та зменшення середньої частоти аберацій на 49,55%, на підставі чого його можна віднести до антимутагенів “середньої” ефективності.

У перспективі досліджень — застосування антиоксидантного препарату для модифікації радіаційно-індукованого ефекту свідка в лімфоцитах крові людини, що дасть можливість встановити роль оксидативного стресу в механізмі розвитку цього феномену.

1. Горовой Л. Ф., Сенюк О. Ф. Комплексная защита от последствий хронического облучения малыми дозами // Материалы конф. “Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация”, 13–14 ноября 2012 г. – Москва, 2012. – С. 14.
2. Тарумов Р. А., Башарин В. А., Антушевич А. А. и др. Современные антиоксиданты как перспективные средства профилактики и лечения радиационных поражений // Там же. – Москва, 2012. – С. 20.
3. Клебанов Г. И. Антиоксиданты. Антиоксидантная активность. Методы исследования 2010. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1289>.
4. Шеметун О. В., Талан О. О., Педан Л. Р. Вплив антиоксидантного препарату на частоту аберацій хромосом у лімфоцитах людини // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клін. імунології та мед. генетики. – 2012. – Вип. 23. – С. 433–439.
5. Шеметун О. В. Цитогенетичні показники в опромінених *in vitro* соматичних клітинах людини при дії антиоксидантного вітамінного препарату // Архів клін. та експерим. медицини. – 2012. – 21, № 2. – С. 204–206.
6. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Методичні рекомендації / КМАПО МОЗ України. – Київ, 2003. – 23 с.
7. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel: Karger, 2005. – 130 p.
8. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии. – Горловка: Лихтар, 2008. – 248 с.

9. *Талан О. О.* Цитогенетичні показники при спонтанному та радіаційно-індукованому соматичному хромосомному мутагенезі в осіб різного віку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15. – Київ, 2012. – 20 с.
10. *Методические* рекомендации по экспериментальному выявлению химических модификаторов мутагенеза и канцерогенеза / Научно-исследовательский институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина. – Москва, 1986. – 10 с.
11. *Семенов В. В., Студенцова И. А.* Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимутагенов в эксперименте // Вестн. РАМН. – 1998. – № 3. – С. 16–20.
12. *Копораска М.* The influence of antioxidant vitamins on the radiation-induced bystander effect in normal human lymphocytes // Сучасні проблеми радіаційних досліджень. XXXV щорічна конф. Європейського т-ва з радіаційних досліджень: Зб. матеріалів. – Київ, 2007. – С. 94–101.
13. *Шеметун О. В.* Результаты ретроспективного цитогенетического обстеження учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, опромінених у високих дозах // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клін. імунології та мед. генетики. – 2011. – Вип. 22. – С. 343–351.
14. *Демина Э. А., Пилинская М. А., Петунин Ю. И., Клошин Д. А.* Радиационная цитогенетика: русско-английский словарь-справочник. – Киев: Здоровье, 2009. – 368 с.

ДУ “Національний науковий
центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 21.02.2013

Е. В. Шеметун

Модификация радиационно-индуцированного цитогенетического эффекта в лимфоцитах периферической крови человека с использованием антиоксидантного витаминного препарата

Исследован цитогенетический эффект в облученных in vitro в дозе 1 Гр лимфоцитах периферической крови человека при отдельном культивировании и при действии антиоксидантного витаминного препарата “Веторон” (содержит витамины А, Е, С) в концентрации 40 мкг/мл. Установлено, что применение антиоксидантного витаминного препарата перед облучением крови обеспечивает снижение радиационно-индуцированной частоты аберраций хромосом в среднем на 49,55%.

O. V. Shemetun

Modification of radiation-induced cytogenetic effects in human peripheral blood lymphocytes using antioxidant vitaminic medicinal product

The results of investigation of the radioinduced cytogenetic effect in human peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro in a dose of 1 Gy under both the separate cultivation and the action of antioxidant “Vetoron” (containing vitamins A, E, C) at a concentration of 40 mg/ml are presented. It is shown that the application of “Vetoron” before the radiation exposure of blood reduced the frequency of radiation-induced chromosomal aberrations by 49.55% on the average.