

**ГЕРМАН Е.Ю.**

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,  
Украина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: elenagerman2009@gmail.com, (050) 403-51-28

## ФОРМИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ В КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЕ ПРОРОСТКОВ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРОРАЩИВАНИИ ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН

**Цель.** Изучить возможность индукции эффекта свидетеля при совместном проращивании в водной среде облученных и необлученных семян. **Методы.** Цитогенетические методы (оценка уровня митотической активности, учет количества ядрышек), а также методы статистического анализа данных. **Результаты.** Эффект радиационной стимуляции дозой 40 Гр зависел от сорта, действие гамма-радиации в дозе 200 Гр снижало уровень митотической активности по сравнению с контролем у обоих сортов. Наблюдали повышение значений митотических индексов в вариантах с совместным проращиванием облученных и необлученных семян в меристеме последних. **Выводы.** Эффект свидетеля формируется на организменном уровне в условиях совместного проращивания облученных и необлученных семян в одной водной среде и проявляется в повышении уровня пролиферации клеток меристемы и интенсификации синтетических процессов в них. Добавление к необлученным семенам семян, облученных высокой дозой гамма-радиации, индуцирует увеличение митотической активности в большей степени, чем добавление семян, облученных относительно небольшой дозой

**Ключевые слова:** эффект свидетеля, радиационная стимуляция, митотическая активность, ядрышки.

Эффект свидетеля, как биологическое явление, был описан в 1992 г. Х. Нагасавой и Дж. Б. Литтлом. Он заключается в возникновении повреждений в необлученных клетках, находящихся рядом с облученными, в момент воздействия излучения. То есть необлученные клетки являются своеобразными «свидетелями» нанесения лучевых повреждений другим клеткам.

К настоящему времени эффект свидетеля продемонстрирован на ряде биологических объектов [1–3], на клеточном и организменном уровнях. Сформировалось мнение, что в клетках, которые не получили прямого облучения, мо-

гут происходить генетические изменения, в частности такие, как возникновение мутаций [4], изменения в экспрессии генов [5], апоптоз.

Схемы экспериментов по индукции эффекта свидетеля включают как непосредственный контакт облученных и необлученных клеток, так и нахождение их в одном и том же культуральном сосуде, а также контакт необлученных клеток со средой, в которой другие клетки подвергались облучению [6]. Очевидно, что эффект свидетеля относится к немишенным эффектам облучения, хотя механизм его формирования полностью не изучен. Предполагают существование двух путей передачи сигнала о радиационном облучении: через межклеточные контакты и путем секреции некоторых биологически активных факторов в культуральную среду.

Основываясь на последнем механизме, была сформулирована цель работы – изучить возможность индукции эффекта свидетеля при совместном проращивании в водной среде облученных и необлученных семян.

### Материалы и методы

Материалом для исследования стали семена лука *Allium cepa* L. сортов Веселка и Ткаченківська, предоставленные Институтом овощеводства и бахчеводства УААН. Семена облучали гамма-радиацией  $Co^{60}$  в ХНУ им. В.Н. Каразина в дозах 40 Гр и 200 Гр, которые, согласно предыдущим исследованиям [7], оказывают соответственно стимулирующее и повреждающее действие на растительный организм.

Семена проращивали при комнатной температуре в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге по такой схеме: 1) контроль – необлученные семена; 2) семена, облученные в дозе 40 Гр; 3) семена, облученные в дозе 200 Гр; для индукции эффекта свидетеля: 4) совместное проращивание контрольных семян и облученных в дозе 40 Гр; 5) совместное

проращивание контрольных семян и облученных в дозе 200 Гр

Проводили фиксацию прорастающих семян в уксусном спирте через каждые 2 часа с момента появления проростков. На давленных препаратах, окрашенных по Фельгену, учитывали митотический индекс для определения уровня пролиферации меристемы проростков и количество ядрышек для определения уровня синтетической активности клеток. Для выявления стимулирующего и повреждающего эффектов доз радиации 40 Гр и 200 Гр, а также эффекта свидетеля полученные в вариантах 2–5 показатели сравнивали с контролем (вариант 1).

Статистический анализ включал определение ошибки выборочной доли; достоверность различий между контролем и опытом оценивали с использованием критерия Фишера [8].

## Результаты и обсуждение

**Влияние гамма-радиации в дозах 40 Гр и 200 Гр на пролиферацию клеток меристемы проростков семян *Allium cepa* L.** Первые деления клеток в контроле и после действия дозы 40 Гр появлялись одновременно. Стимулирующий эффект облучения 40 Гр проявлялся в увеличении доли делящихся клеток в срок первой фиксации. В более поздние сроки митотическая активность в варианте 40 Гр существенно не отличалась от контроля в меристеме сорта Веселка (рис. 1). В меристеме сорта Ткаченківський наблюдали четко выраженный стимулирующий эффект дозы 40 Гр ( $P < 0,05$ ). Действие гамма-радиации в дозе 200 Гр достоверно ( $P < 0,001$ ) снизило уровень митотической активности по сравнению с контролем у обоих сортов.

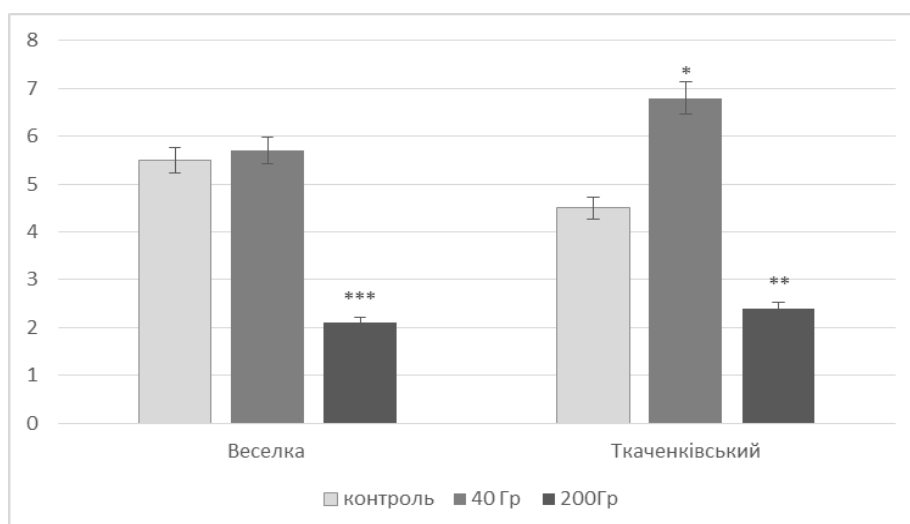


Рис. 1. Средние за весь срок наблюдения значения митотического индекса (%) в меристеме проростков облученных и необлученных семян: \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ ; \*\* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,01$ ; \*\*\* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,001$ .

В период прорастания семян важной для обеспечения функционирования клетки является интенсивность синтеза рибосомальной РНК. Количество и структурно-функциональное состояние ядрышек является важным показателем физиологического состояния клетки и организма в целом. С повышением метаболической активности клетки, в частности в меристеме прорастающего семени, возможно увеличение количества ядрышек за счет амплификации генов участков хромосом, содержащих ядрышковые организаторы.

Согласно результатам учета количества

ядрышек в клетках меристемы сорта Веселка, действие радиации в дозе 40 Гр стимулирует синтетическую активность ядер (рис. 2), что отражается в изменении количества ядрышек: появляются клетки с 3 ядрышками (3 %), увеличиваются доли клеток с 2 ядрышками (с 3 % в контроле до 16 %). В таких клетках активнее происходит синтез рибосомной РНК, сборка рибосом и, соответственно, синтез белка. Таким образом, на начальных этапах роста проростков семян исследуемых сортов лука был отмечен стимулирующий эффект облучения в дозе 40 Гр на уровень митотической активности, выражен-

ный в разной степени в зависимости от сорта. Также увеличивалось количество ядрышек в ядрах клеток меристемы.

### Формирование и проявление эффекта свидетеля

В 2000-х гг. была продемонстрирована передача эффекта от радиационного воздействия между организмами, которые находятся в общей водной среде [9, 10]. Изменение учитываемых показателей в меристеме проростков необлученных семян, проращиваемых в одной водной среде вместе с облученными, позволяет судить о передаче эффекта свидетеля на измененном уровне.

В вариантах с совместным проращиванием облученных и необлученных семян наблюдали повышение значений митотических индексов в меристеме последних (рис. 3). Результаты исследования не позволяют выявить связь формирования эффекта свидетеля с наличием стимулирующего эффекта дозы 40 Гр, т. к. у сорта Веселка, у которого стимуляция ростовых процессов не происходила в варианте «40 Гр», тем не менее значения митотических индексов в варианте «контроль+40 Гр» были выше контрольных. Максимально эффекта свидетеля был выражен в варианте «контроль+200 Гр».

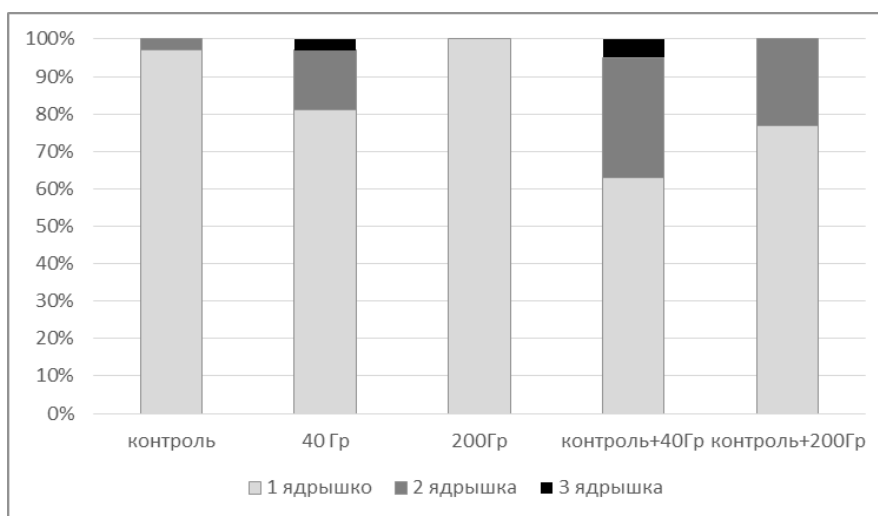


Рис. 2. Количество ядрышек в ядрах клеток меристемы проростков семян лука в контроле и после действия гамма-радиации.

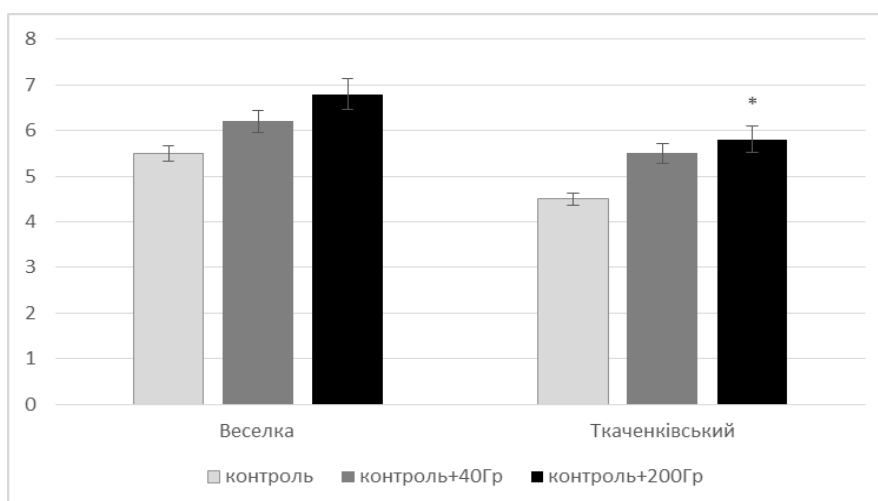


Рис. 3. Проявление эффекта свидетеля в меристеме проростков необлученных семян, проращиваемых вместе с облученными, по критерию изменения митотической активности (%): \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .

Учет количества ядрышек (рис. 2) показал, что совместное проращивание облученных и необлученных семян стимулирует ядрышковую активность: в меристеме необлученных семян увеличивается количество клеток с 2–3 ядрышками и снижается количество клеток с 1 ядрышком. Для сорта Веселка характерна максимальная стимуляция по этому показателю в варианте «контроль+40 Гр».

Таким образом, в меристеме проростков необлученных семян, проращиваемых в одной водной среде с облученными, увеличивается митотическая активность и активность синтетических процессов. Чем выше доза облучения, тем большее увеличение митотической активности происходит в меристеме необлученных семян. В [11] указано, что на клеточном уровне эффект свидетеля проявляется лучше в области именно высоких и средних доз, чем при воздействии малых.

Согласно [12], эффект свидетеля бывает не только повреждающим (передача сигнала к нестабильности генома, к повреждениям ДНК, апоптозу и т. п.), но и стимулирующим (передача сигнала к адаптивному ответу и гормезису). При совместном проращивании необлученных и облученных семян в зависимости от генотипа сорта и исходной естественной активности физиологических процессов стимуляция при формировании эффекта свидетеля проявляется как в увеличении уровня пролиферации клеток, так и в изменении активности синтетических процессов.

### Литература

1. Widela M., Lalika A., Krzywona A., Poleszczuk J., Fajarewicz K., Rzeszowska-Wolny J. The different radiation response and radiation-induced bystander effects in colorectal carcinoma cells differing in p53 status. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015. Vol. 778. P. 61–70. doi: doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.06.003.
2. Ермаков А.В., Костюк С.В., Еголина Н.А., Малиновская Е.М., Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. Фрагменты ДНК, обнаруживаемые в среде культивирования после воздействия ионизирующей радиации в адаптирующих дозах, являются фактором стресс-сигнализации между лимфоцитами и клетками-свидетелями. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2007. Т. 47, № 2. С. 133–140.
3. Reis P., Lourenço J., Carvalho F.P., Oliveira J., Malta M., Mendo S., Pereira R. RIBE at an inter-organismic level: a study on genotoxic effects in *Daphnia magna* exposed to waterborne uranium and a uranium mine effluent. *Aquatic Toxicology*. 2018. doi: doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.007.
4. Воробцова И.Е., Колесникова И.С. Исследование радиационно-индуцированного «эффекта свидетеля» на модели адаптивного ответа в совместной культуре лимфоцитов людей разного пола. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2007. Т. 47, № 6. С. 1–5.
5. Verma N., Tiku A.B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017. Vol. 773. P. 104–121. doi: doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
6. Шеметун О.В., Пілінська М.А. Радіаційно-індукований «ефект свідка». *Цитологія і генетика*. 2007. Т. 41, № 4. С. 66–71.
7. Герман Е.Ю., Долгова Т.А. Исследования по цитофизиологии и радиационной генетике растений на биостанции Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. *Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна*. 2014. Вип. 20, № 1100. С. 22–28.
8. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. 288 с.

Передача эффекта свидетеля возможна как при непосредственном контакте облученных и необлученных клеток (через щелевые межклеточные контакты), так и через выделяемые в культуральную среду медиаторы. При проращивании облученных и необлученных семян в одной водной среде передача радиационного эффекта, очевидно, осуществляется некими веществами, которыми могут быть, например, активные формы кислорода [13], гормоны. Очевидно, концентрация и спектр веществ, выделяемых в водную среду при прорастании облученных семян, увеличивается с увеличением дозы облучения, что изменяет интенсивность ответа необлученных семян на совместное проращивание.

### Выводы

1. В работе показана возможность формирования эффекта свидетеля на организменном уровне в условиях совместного проращивания облученных и необлученных семян в одной водной среде.

2. Эффект свидетеля проявляется в повышении уровня пролиферации клеток меристемы и интенсификации синтетических процессов в них.

3. Добавление к необлученным семенам семян, облученных высокой дозой гамма-радиации, индуцирует увеличение митотической активности в большей степени, чем добавление семян, облученных относительно небольшой дозой.

9. Mothersill C., Seymour C. Relevance of radiation-induced bystander effects for environmental risk assessment. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2002. Т. 42, № 6. С. 586–587.
10. Кравец А.П., Венгжен Г.С., Гродзинский Д.М. Эффекты дистанционного взаимодействия облученных и необлученных растений. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2009. Т. 49, № 4. С. 490–494.
11. Котеров А.Н. Перспективы учета «Эффекта свидетеля» при оценке радиационных рисков. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*. 2011. № 1 (5). С. 7–19.
12. Котеров А.Н., Вайнсон А.А. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПДЭ для различных диапазонов доз. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2015. Т. 60, № 3. С. 5–31.
13. Литтл Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2007. Т. 47, № 3. С. 262–272.

## References

1. Widela M., Lalika A., Krzywona A., Poleszczuk J., Fajurewicz K., Rzeszowska-Wolny J. The different radiation response and radiation-induced bystander effects in colorectal carcinoma cells differing in p53 status. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015. Vol. 778. P. 61–70. doi: doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.06.003.
2. Ermakov A.V., Kostyuk S.V., Egolina N.A., Malinovskaya E.M., Veyko N.N., Spitkovskiy D.M. DNA fragments found in the culture medium after exposure to ionizing radiation in adapting doses are a means of stress signaling between lymphocytes and the witness cells. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2007. Vol. 47, N. 2. P. 133–140.
3. Reis P., Lourenço J., Carvalho F.P., Oliveira J., Malta M., Mendo S., Pereira R. RIBE at an inter-organismic level: a study on genotoxic effects in *Daphnia magna* exposed to waterborne uranium and a uranium mine effluent. *Aquatic Toxicology*. 2018. doi: doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.007.
4. Vorobtsova I.E., Kolesnikova I.S. Investigation of Radiation-Induced “Bystander Effect” Using Model of Adaptive Response in Mixed Lymphocyte Culture from Humans of Different Gender. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2007. Vol. 47, N. 6. P. 1–5.
5. Verma N., Tiku A.B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017. Vol. 773. P. 104–121. doi: doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
6. Shemetun O.V., Pilinska M.A. Adiation-induced bystander effect. *Tsitologiya i Genetika*. 2007. Vol. 41, N. 4. P. 66–71.
7. German O.Yu., Dolgova T.A. Researches on plant cytophysiology and radiation genetics at the biological station of V.N. Karazin Kharkov National University. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology*. 2014. Vol. 20, N. 1100. P. 22–28.
8. Atramentova L.O., Utevska O.M. Statistical methods in biology. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkov National University, 2007. 288 p.
9. Mothersill C., Seymour C. Relevance of radiation-induced bystander effects for environmental risk assessment. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2002. Vol. 42, N. 6. P. 586–587.
10. Kravets A.P., Vengzhen G.S., Grodzinskiy D.M. Effects of remote interaction of irradiated and non-irradiated plants. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2009. Vol. 49, N. 4. P. 490–494.
11. Koterov A.N. Prospects for the registration of the "bystander effect" in the assessment of radiation risks. *Mediko-biologicheskie problemy zhiznedejatelnosti*. 2011. N. 1 (5). P. 7–19.
12. Koterov A.N., Vaynson A.A. Biological and medical effects of low LET radiation for different dose ranges. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost*. 2015. Vol. 60, N. 3. P. 5–31.
13. Littl D.B. Non-existent effects of ionizing radiation: conclusions regarding low-dose exposures. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2007. Vol. 47, N. 3. P. 262–272.

## GERMAN O.Yu.

V.N. Karazin Kharkov National University,

Ukraine, 61077, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: elenagerman2009@gmail.com

## BYSTANDER EFFECT FORMATION IN THE SPROUT ROOT MERISTEM IN CONDITION OF IRRADIATED AND NON-IRRADIATED SEEDS JOINT GROWING

**Aim.** To study the possibility of bystander effect inducing in the joint germination in a common aqueous environment of irradiated and non-irradiated seeds. **Methods.** Cytogenetic methods including mitotic activity level estimation, accounting for the number of nucleoli, and methods for statistical analysis of the data. **Results.** The effect of radiation stimulation with a dose of 40 Gy was dependent on the variety, and the effect of gamma radiation at a dose of 200 Gy reduced the level of mitotic activity in comparison with the control in both varieties. Mitotic indices increase in the meristem of non-irradiated seeds while growing with irradiated one. **Conclusions.** The bystander effect is formed on the organismic level under condition of growing of irradiated and non-irradiated seeds in a common aquatic environment and it is manifested as an increase in the level of meristem cells proliferation and in the intensification of synthetic processes. The addition of irradiated with a high dose of gamma radiation seeds to the non-irradiated seeds induces an increase in mitotic activity largely than the addition of seeds irradiated with a relatively small dose.

**Keywords:** bystander effect, radiation stimulation, mitotic activity, nucleoli.

**ГЕРМАН О.Ю.**

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,  
Україна, 61077, м. Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: elenagerman2009@gmail.com*

**ФОРМУВАННЯ ЕФЕКТУ СВІДКА В КОРЕНЕВІЙ МЕРИСТЕМІ ПРОРОСТКІВ ПРИ СУМІСНОМУ ПРОРОЩУВАННІ ОПРОМІНЕНОГО І НЕОПРОМІНЕНОГО НАСІННЯ**

***Мета.** Дослідити можливість індукції ефекту свідка за умови сумісного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння у спільному водному середовищі. **Методи.** Цитогенетичні методи (оцінка рівня мітотичної активності, облік кількості ядерць), а також методи статистичного аналізу даних. **Результати.** Ефект радіаційної стимуляції дозою 40 Гр залежав від сорту, дія гамма-радіації в дозі 200 Гр знижувала рівень мітотичної активності в порівнянні з контролем у обох сортів. Спостерігали підвищення значень мітотичних індексів у варіантах зі спільним пророщуванням опроміненого і неопроміненого насіння в меристемі останніх. **Висновки.** Ефект свідка формується на рівні організму в умовах спільного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння в одному водному середовищі і проявляється в підвищенні рівня проліферації клітин меристеми і інтенсифікації синтетичних процесів в них. Додавання до неопроміненого насіння насіння, опроміненого високою дозою гамма-радіації, індукує збільшення мітотичної активності в більшій мірі, ніж додавання насіння, опроміненого відносно невеликою дозою.*

*Ключові слова:* ефект свідка, радіаційна стимуляція, мітотична активність, ядерця.