

РАДИОИНДУЦИРОВАННЫЙ «БАЙСТЭНДЕР» ЭФФЕКТ И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКИЙ СМЫСЛ

В результате проведенных на кератиноцитах человека исследований впервые в мире было показано, что вещества с антирадикальными свойствами (меланин и мелатонин) способны частично нейтрализовать «байстэндер» факторы. Выраженность защитного эффекта антиоксидантов не зависела от дозы облучения. Мелатонин обладал более выраженным защитным эффектом, чем меланин. Полученные результаты позволили сделать вывод о свободно-радикальной природе «байстэндер» факторов.

Ключевые слова: «байстэндер» эффект, меланин, мелатонин, антиоксиданты, радиопротекторы, кератиноциты человека.

У результаті проведених досліджень було показано, що речовини з антирадикальними властивостями (меланін і мелатонін) можуть частково нейтралізувати «байстендер» фактори. Отримані результати дозволили зробити висновок про вільно-радикальну природу «байстендер» факторів.

Ключові слова: «байстендер» ефект, меланін, мелатонін, антиоксиданти, радіопротектори, кератиноцити людини.

The results of the research on human keratinocytes have shown that substances with antiradical properties (melanin, melatonin) were able to partially neutralize bystander factors. The protective effect does not depend on radiation dose. Melatonin provides more effective protective action than melanin. The data allows making the conclusion about a free radical nature of bystander factors. Biological value of bystander effect is discussed.

Key words: bystander effect, melanin, melatonin, antioxidants, radioprotectors, human keratinocytes

Согласно классической догме радиобиологии, интерпретированной из теории мишени, генетические повреждения возникают только во время или в течении очень короткого периода сразу после передачи энергии в ДНК ядра (мишленные эффекты), т. е. в процессе облучения либо под действием вызванных им короткоживущих свободных радикалов. При этом биологические последствия наблюдаются только в течение одного клеточного поколения.

Радиационно-индуцированный «байстэндер» эффект (РИБЭ) – это явление передачи информации от облученных клеток необлученным, при котором клеточные повреждения (хромосомные aberrации, апоптоз, микроядра, мутации и т. д.) наблюдаются в необлученных клетках. Об этом эффекте было сообщено в 1954 году Парсонсом [1], который показал, что у детей, у которых для лечения лейкемии облучали селезенку, наблюдалось повреждение костного мозга. В последние 20 лет

было получено достаточно много информации о «байстэндер» эффекте, однако его природа и механизмы до сих пор не установлены.

В ранних работах по данной тематике Нагасава и Литтл [2] облучали клетки яичников китайского хомячка (СНО клетки) альфа-частицами в дозах между 0,03 и 0,25 сGy, так, чтобы только около 1 % клеток были подвержены прямому действию облучения. Однако хромосомные повреждения наблюдались более чем у 30 % популяции. Таким образом, их данные показали, что повреждение ДНК может быть вызвано в большем количестве клеток, чем в том, которое подверглось облучению. Это было неожиданным и противоречило модели прямого повреждения.

Было показано, что облучение 20-тью альфа-частицами каждой клетки из 20 % случайно выбранных клеток гибрида $A_{(L)}$ способствует трехкратному увеличению числа мутаций по сравнению с ожидаемым, полагая, что данный

эффект не существует. Эксперименты, проведенные Аззамом и др. [3] показали, что при облучении альфа частицами, происходит подавление таких генов, как *p53* и *p21*, вовлеченных в процессы контроля клеточного цикла и индукции апоптоза, и этот процесс можно выразить в нелинейном виде после облучения низкими дозами радиации.

Множество исследований «байстэндер» эффекта стали возможными благодаря использованию микролучей (microbeam), позволяющих малому количеству заряда (легких ионов) попасть в единичное клеточное ядро.

Клеточные реакции, вызванные с помощью этого эффекта, включают в себя индукцию хромосомных аберраций, мутации, смерть клетки, апоптоз (или программируемую клеточную смерть), злокачественную трансформацию и генетическую нестабильность. В работе Бишаи [4] был продемонстрирован «байстэндер» эффект в многоклеточной модели с помощью группы клеток, помеченных тритирированным тимидином (dThd). Малая область распространения бета-частиц ^3H вызывает лишь поражение меченых клеток, а немеченые клетки не подвергаются воздействию излучения. Однако в результате, немеченые клетки также оказываются пораженными.

В 1997 К. Мазерсил и К. Сеймур [5] обнаружили, что вещества цитоплазмы из облученных гамма-лучами эпителиальных клеток человека оказывали повреждающее действие на необлученные клетки. Этот факт, во-первых, доказал, что и гамма-радиация способна вызывать «байстэндер» эффект, а во-вторых, был открыт удачный способ исследования данного эффекта в клетках человека.

Начались интенсивные исследования этого феномена и в частности, его механизмов. Есть свидетельства существования как минимум двух независимых путей передачи информации от облученной клетки необлученным: 1) через межклеточные взаимодействия и 2) через клеточные факторы, секретируемые в культуральную среду.

Межклеточные коммуникации осуществляются с помощью щелевидных соединений (узких каналов приблизительно 2 нм в диаметре), которые связывают цитоплазмы двух смежных клеток и способствуют диффузии мелких молекул. Их роль подтверждается тем, что линдан (γ -изомер гексахлороциклогексана), ингибитор межклеточных процессов, осуществляемых через щелевидные соединения, уменьшает «байстэндер» эффект.

В то же время ряд данных свидетельствует о том, что «байстэндер» эффект может возникать без участия межклеточных взаимодействий. Передачу информации могут осуществлять цитокины или другие факторы, увеличивающие внутриклеточный уровень различных форм активного кислорода в необлученных клетках. Предполагается, что активные формы кислорода выступают в качестве сигнальных молекул, регулирующих характер отклика клетки (пролиферация, дифференциация, апоптоз) на стресс – воздействие.

Показано также, что повреждающий фактор может иметь белковую природу, так как он

термолабилен, а при воздействии ингибиторами белков не формируется. Кроме того, выявлена также активизация экспрессии различных генов, например, генов стресс-зависимых киназ и цитокинов.

Таким образом, сведения о механизмах межклеточных взаимодействий противоречивы и их исследование является актуальным как для решения фундаментальных проблем биологии, так и с практической точки зрения, в частности, для расчетов радиационных рисков, а также для радиационной терапии рака.

Одним из способов выяснения механизмов «байстэндер» эффекта и природы вызывающих этот феномен факторов является исследование влияния на его проявление модификаторов. С этой целью нами было изучено влияние на «байстэндер» эффект меланина и мелатонина, обладающих высокой антирадикальной активностью.

Меланин способен перехватывать и превращать в тепло все виды физической энергии – магнитную, электрическую, радиационную, звуковую, тепловую и т. д. [6]. Кроме того, меланин также является антиоксидантом, нейтрализует потенциально опасные свободные радикалы.

Существуют доказательства радиопротекторного действия меланина. Меланин очень эффективен при защите наследственных структур от мутагенного действия малых доз радиации, при этом чем ниже доза радиационного воздействия, тем выше протекторное действие меланина [7]. Всё это позволило предположить, что меланин может оказать воздействие на передачу сигналов от облученных клеток к необлученным.

Мелатонин – это нейрогормон шишковидной железы эпифиза. Мелатонин в организме обладает множеством функций, одной из которых является антиоксидантная [8]. Во многих исследованиях были показаны радиозащитные свойства мелатонина [9; 10].

Материалы и методы

1. *Клеточная культура.* Клеточная линия HPV-G клеток – кератиноциты человека, иммортализованные трансфекцией вируса папилломы человека, вследствие чего клетки являются мутантными по *p53*. Они растут в культуре с формированием монослоя, при этом отсутствуют межклеточные контакты. HPV-G клетки культивировали в среде Дульбекко DMEM: F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % пенициллина-стрептомицина, 1 % L-глутамин и 1 $\mu\text{г/мл}$ гидрокортизона. Клетки инкубировали в термостате при 37°C в условиях 95 % влажности и 5 % содержания двуокси углерода и пересевали трипсинизацией каждые 8-10 дней.

2. *Модификаторы.* Синтетический мелатонин (Сигма, Германия) или меланин (Белфарм объединение, Минск) вводили в клеточную среду за 30-60 мин до облучения либо через 1 час после облучения в донорскую культуральную среду от облученных клеток перед фильтрацией и переносом клеткам-реципиентам.

3. *Облучение.* HPV-G клетки облучали дозой 0,5 Гр при комнатной температуре через 12-24

часа после посева с помощью кобальтовой пушки (терапевтический источник ^{60}Co) с мощностью дозы 1,9 Гр/мин на расстоянии 80 см от источника в 25 см² пластиковых флаконах либо на стеклянных покровных стеклах (диаметром 23 мм).

4. Колониеобразующий тест.

После трипсинизации, производили подсчет количества клеток в 1 мл клеточной суспензии с помощью автоматического счетчика-анализатора числа клеток (Coulter Z1) и проводили посев необходимого количества клеток в 25 см² пластиковые флаконы (NUNC, США). Использовали три типа флаконов: прямого облучения, доноров «байстэндер» эффекта и реципиентов «байстэндер» эффекта. Посев во флаконы доноров РИБЭ составлял $0,5 \times 10^6$ клеток, реципиентов РИБЭ и прямого облучения – 300 клеток. Каждый тип флаконов состоял из 1) контроля; 2) контроль + меланин; 3) облучение и 4) облучение + радиопротектор. После посева, клетки инкубировали при 37°C в термостате в течение 12 часов, затем флаконы прямого облучения и доноров РИБЭ облучали и через 1 час после облучения (в течение которого выделился в культуральную среду РИБЭ фактор) изолировали донорскую среду и вносили в нее радиопротектор на 30-60 мин. Затем после фильтрации через 0,22 мкм стерильные шприцевые фильтры (Nalgene, США) донорскую среду переносили во флаконы к клетками-реципиентами РИБЭ. Через 9-10 дней инкубирования (после формирования колоний) клетки затем окрашивали

карболовым фуксином и подсчитывали число колоний.

Полученные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка во всех случаях. Проводили проверку распределения, и так как оно было нормальным – достоверность определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

В расчетах использовали следующие понятия и формулы:

- параметр «эффективность посева» (ЭП) – это отношение числа посеянных *in vitro* клеток к количеству сформированных колоний, и представляется в виде процента конечного числа образованных колоний к числу изначально посеянных клеток.
- параметр «выжившая фракция» (ВФ) рассчитывается как отношение эффективности посева облученных клеток к эффективности посева контрольных клеток (в %).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты приведены в таблицах 1 и 2.

Данные по колониеобразующей способности клеток представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка во всех случаях. Эффективность посева (ЭП) – это процентное соотношение числа образовавшихся колоний к числу посеянных клеток.

В таблице 2 приведены результаты изучения влияния меланина на передачу «байстэндер» факторов при дозе облучения 1 Гр.

Таблица 1

Эффект меланина на выживаемость HPV-G клеток (доза 0,5 Гр)

		Клеток посеяно	Среднее число колоний	p	ЭП, %
Прямое облучение	Контроль	300	146 \pm 3,2	–	49 \pm 1,1
	Меланин	300	143 \pm 1,2	> 0,05	48 \pm 0,4
	0,5 Гр	300	108 \pm 3,5	< 0,01	36 \pm 1,2
	0,5 Гр + Мел	300	123 \pm 1,5	< 0,01	41 \pm 0,5
РИБЭ	Контроль	300	147 \pm 2,2	–	49 \pm 0,7
	Меланин	300	138 \pm 1,2	> 0,05	46 \pm 0,4
	0,5 Гр	300	119 \pm 0,6	< 0,01	40 \pm 0,2
	0,5 Гр + Мел	300	130 \pm 1,2	< 0,01	43 \pm 0,4

Таблица 2

Эффект меланина на выживаемость HPV-G клеток (доза 1 Гр)

		Клеток посеяно	Среднее число колоний	p	ЭП, %
Прямое облучение	Контроль	300	158 \pm 0,6	–	53 \pm 0,2
	Меланин	300	156 \pm 0,7	> 0,05	52 \pm 0,2
	1 Гр	300	123 \pm 1,2	< 0,01	41 \pm 0,4
	1 Гр + Мел	300	141 \pm 1,2	< 0,01	47 \pm 0,4
РИБЭ	Контроль	300	152 \pm 2,0	–	51 \pm 0,7
	Меланин	300	151 \pm 1,0	> 0,05	50 \pm 0,3
	1 Гр	300	114 \pm 2,5	< 0,01	38 \pm 0,8
	1 Гр + Мел	300	130 \pm 1,8	< 0,01	43 \pm 0,6

Из полученных данных видно, что среда от облученных клеток значительно снижает колониеобразующую способность HPV-G клеток, т. е. наблюдается «байстэндер» эффект. Не обнаружено влияния меланина на колониеобразующую способность клеток. Колониеобразующая способность клеток, облученных в дозе 0,5 или 1 Гр с добавлением меланина выше, чем клеток, облу-

ченных без введения меланина, что подтверждает радиозащитное действие меланина, показанное ранее [7].

Наиболее интересен факт, что «байстэндер» эффект в случае использования меланина оказался менее выраженным. Это позволяет предположить, что меланин способен подавлять сигналы, передаваемые от облученных клеток необлученным.

Таким образом, можно сделать вывод, что меланин способен модифицировать «байстэндер» эффект.

В таблице 3 представлены результаты изучения способности мелатонина влиять на «байстэндер» эффект.

Таблица 3

Эффект мелатонина на выживаемость HPV-G клеток (доза 0,5 Гр)

		Клеток посеяно	Среднее число колоний	P	ЭП, %
Прямое облучение	Контроль	300	149 ± 2,3	–	50 ± 0,8
	Мелатонин	300	150 ± 3,5	> 0,05	50 ± 1,2
	0,5 Гр	300	97 ± 3,2	< 0,01	32 ± 1,1
	0,5 Гр +Мт	300	123 ± 2,3	< 0,01	41 ± 0,8
РИБЭ	Контроль	300	150 ± 0,8	–	50 ± 0,3
	Мелатонин	300	150 ± 2,9	> 0,05	50 ± 1,0
	0,5 Гр	300	118 ± 3,8	< 0,01	39 ± 1,3
	0,5 Гр +Мт	300	132 ± 3,5	< 0,01	44 ± 1,2

Полученные результаты свидетельствуют о том, что число образовавшихся колоний во флаконах контрольных клеток с мелатонином практически не отличается от контрольных значений ($p > 0,05$ – разница недостоверна). Таким образом, мелатонин так же, как и меланин, не обладает цитотоксическим или стимулирующим колониобразующую способность эффектом.

Как видно из таблицы 3, наблюдается значительное снижение выживаемости HPV-G клеток при прямом облучении в дозе 0,5 Гр (на 26 % по сравнению с контролем, $p < 0,01$) и после переноса среды от облученных клеток клеткам-реципиентам (на 20 %, $p < 0,01$). Введение мелатонина в среду непосредственно облученных клеток приводит к значительному повышению уровня выживаемости (на 12 % по сравнению с клетками, облученными без мелатонина, $t = 4,84$; $p < 0,01$), однако он все равно ниже, чем в контрольных клетках.

При сравнении эффектов меланина и мелатонина видно, что мелатонин более эффективен при защите как от прямого действия ионизирующего излучения, так и от РИБЭ.

Мелатонин, как и меланин, является очень сильным антиоксидантом. Однако мелатонин способен к нейтрализации гораздо большего количества типов различных свободных радикалов по сравнению с меланином. Это, возможно, является основной причиной его лучшей защитной эффективности при «байстэндер» эффекте.

Таким образом, оба исследованных антиоксиданта оказались способными снижать повреждающее действие «байстэндер» факторов на выживаемость HPV-G клеток, однако мелатонин оказался более эффективным, чем меланин.

Изучение «байстэндер» эффекта имеет большое значение для понимания ответа организма на радиационное воздействие при облучении в малых дозах. При расчете рисков малых доз радиации используются модели, основанные на прямом действии облучения на ядерную ДНК, но если «байстэндер эффект» усиливает реакцию организма на воздействие ионизирующей радиации, искажая зависимость «доза – эффект», то необходим перерасчет радиационных рисков, и в том числе

риска канцерогенеза. При этом возможны различные формы нелинейности в зависимости «доза – эффект» в районе малых доз.

Знание этих закономерностей особенно важно для радиационной терапии рака, поскольку расчёт используемых для воздействия на опухоль доз зависит от того, приводит ли «байстэндер эффект» к увеличению числа трансформированных клеток.

Особенно важен вопрос, является ли «байстэндер эффект» повреждающим механизмом или, наоборот, защитным?

С одной стороны, «байстэндер эффект» увеличивает число поврежденных одиночным радиационным треком клеток, и тем самым усиливает эффект облучения. Тогда не понятно, почему такой феномен сохранился в ходе эволюции? Зачем он нужен?

С другой стороны, возможно, что главной функцией этого эффекта является усиление сигнала тревоги, вызванной облучением. Можно предположить, что защитные системы организма не всегда могут отреагировать на повреждения одиночных клеток внутри ткани, поэтому увеличение числа дефектных клеток необходимо для индукции и стимуляции систем, ответственных за уменьшение риска трансформации клеток в многоклеточном организме. При этом происходит репарация повреждений или апоптоз – удаление клеток, которые могли бы быть трансформированы, например, в раковые клетки. Если «байстэндер эффект» осуществляет в организме защитные функции, становится понятным, зачем эволюция его сохранила.

Остаются без ответа и следующие вопросы – почему в одних случаях облучение вызывает адаптивный ответ, а в других – «байстэндер эффект»? Являются ли эти события двумя взаимоисключающими ответами на воздействие радиации или могут происходить и то, и другое? Если да, то происходят ли они одновременно или в разное время? Это разнонаправленные события или они служат одной и той же цели – защите организма от облучения? Можно предположить, что усиление повреждения («байстэндер эффект») при воздействии малых доз необходимо для индукции адаптивного ответа.

Понимание эффектов радиации как скоординированного многоклеточного ответа, поражающего не только облученные, но и необлученные клетки, поможет определить вклад этих эффектов в оценку радиационных рисков. В результате при оценке

радиационного риска во всех моделях канцерогенеза однозначно должны приниматься во внимание не только мишеные, но и немишеные аспекты радиационного воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagasawa H., Little J.B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles // *Cancer Res.* – 1992. – № 52. – P. 6394-6396.
2. Parsons W.B., Watkins C.H., Pease G.L., Childs D.S. Changes in sternal bone marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukaemia // *Cancer.* – 1954. – № 7. – P. 179-189.
3. Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B. Direct evidence for the participation of gap junction mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – № 98, Vol. 2. – P. 473-478.
4. Bishayee A., Rao D.V., Howell R.W. Evidence for pronounced bystander effects caused by nonuniform distributions of radioactivity using a novel three-dimensional tissue culture model // *Radiat. Res.* – 1999. – № 152. – P. 88-97.
5. Mothersill C., Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1997. – № 71. – P. 421-427.
6. Mosse I.B., Lyach I.P. Influence of melanin on mutation load in *Drosophila* population after long-term irradiation // *Radiation Research.* – 1994. – V. 139, № 3. – P. 356-358.
7. Mosse I.B., Kostrova L.N., Subbot S.T., Maksimenya I., Molophei V.P. Melanin decreases clastogenic effects of ionizing radiation in human and mouse somatic cells and modifies the radioadaptive response. // *Radiation and Envir. Biophysics.* – 2000. – № 1, Vol. 39. – P. 47-52.
8. Marozik P., Mothersill C., Seymour C., Mosse I., Melnov S. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident // *Exp. Hematol.* – 2007. – № 35, Vol. 4, Suppl. 1. – P. 55-63.
9. Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J.C., Sainz R.M., Reiter R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin // *J. Pineal. Res.* – 2003. – № 34, Vol. 1. – P. 75-78.
10. Vijayalaxmi, Thomas Jr. C.R., Reiter R.J., Herman T.S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – № 20, Vol. 10. – P. 2575-2601.

Рецензенти: Мельнов С.Б. проф., д.б.н. (МГЭУ им. А.Д. Сахарова);
Кострова Л.Н. и к.б.н. (ИГЦ НАН Беларуси).

© Моссэ И.Б., Морозик П.М., 2010

Стаття надійшла до редколегії 10.06.2010 р.