

Индуцирана от йонизиращи лъчения геномна нестабилност и възможна превенция срещу развитието на остри радиационни поражения или късни стохастични ефекти

Галина Рачева

НИИ по Радиационна защита и радиобиология,
Военномедицинска академия, София

Резюме

Откриването и използването на подходящи радиопротектори в значителна степен може да намали риска от развитие на остър радиационен синдром, радиационно-индуциран катаракт или хронични радиационни поражения (левкемии или солидни тумори), след облъчване с еднократна надпрагова доза йонизираща радиация ($\geq 1\text{Gy}$) или с фракционирани ниски дози, за по-дълъг период от време, с обща сумарна (акумулативна) доза надвишаваща праговата. През последните години се установи, че естествени, клетъчни метаболити могат да бъдат използвани за превенция при облъчване с йонизираща радиация, като нетоксични радиопротектори.

Настоящото изследване беше насочено към изследване на радиопротективната способност на две природни аминокиселини – N-ацетил-L-цистеин ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$) и триметилглицин (бетаин, $(\text{CH}_3)_3\text{N} + \text{CH}_2\text{CO}_2^-$), и възможността им да предпазят от развитие или да намалят степента на радиационното поражение. Резултатите от изследването показаха съществено намаляване на радиационно-индуцирани увреждания в ДНК при превантивно третиране с изследваните вещества.

Ключови думи: N-ацетил-L-цистеин, триметилглицин, йонизираща радиация, радиопротектор

Ionizing radiation-induced genomic instability and possible prevention of development of acute radiation injuries or late stochastic effects

Galina Racheva

Research Laboratory of Radiation Protection and Radiobiology,
Military Medical Academy, Sofia

Abstract

The discovery and use of appropriate radioprotectors could significantly reduce the risk of acute radiation syndrome, radiation-induced cataracts, or chronic radiation damage (leukemia or solid tumors) after irradiation with an overdose of ionizing radiation ($\geq 1\text{Gy}$) or exposure to fractionized doses of IR with an accumulative dose over the threshold. During the last years of research work, it was discovered that natural cellular metabolites could be used for prevention against ionizing radiation as non-toxic radioprotectors.

The current study was focused on examining the radioprotective activity of two natural amino acids, N-acetyl-L-cysteine ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$) and trimethylglycine (betaine, (betaine, $(\text{CH}_3)_3\text{N} + \text{CH}_2\text{CO}_2^-$), and their ability to prevent or reduce the extent of radiation damage. The survey results showed a significant reduction of radiation-induced DNA damage in preventive treatment with the test substances.

Keywords: N-acetyl-L-cysteine, trimethylglycine, ionizing radiation, radioprotector

Кореспонденция:

Галина Рачева, гм
e-mail: galina_ra4eva@abv.bg

Correspondence:

Ms. Galina Racheva, PhD
e-mail: galina_ra4eva@abv.bg

Въведение

Основна цел пред учените, изследващи влиянието на йонизиращата радиация върху биологичните обекти, е изясняване на всички химични, физични и биологични процеси, свързани с възникване на радиационно поражение и възможност за неговото предотвратяване [1-2]. Източниците на радиация, действащи върху биологични обекти и в частност върху човешкия организъм, могат да бъдат извън облъчваните, биологични обекти или инкорпорирани вътре в тях (външно и вътрешно облъчване) [3-4]. Откриването и използването на подходящи радиопротектори в значителна степен може да намали риска от развитие на остър радиационен синдром, радиационно-индуциран катаракт или хронични радиационни поражения (левкемии или солидни тумори), след облъчване със сравнително високи дози радиация. Основна характеристика на радиопротектора е да бъде нетоксичен, когато е приложен в ефективна за радиопротекция концентрация.

През последните години се установи, че естествени, клетъчни метаболити могат бъдат използвани за превенция при облъчване с йонизираща радиация, като нетоксични радиопротектори [5]. Настоящото изследване беше насочено към изследване на радиопротективната способност на две природни аминокиселини – N-ацетил-L-цистеин ($C_5H_9NO_3S$) и триметилглицин (бетаин, $(CH_3)_3N+CH_2CO_2^-$), и възможността им да предпазват от развитие или да намалят степента на тежко радиационно поражение.

Триметилглицин (бетаин) е N-триметилирана аминокиселина, с емпирична формула $(CH_3)_3N+CH_2CO_2^-$, която се синтезира в клетката при окисление на холин (триметиламиноетанол) и се метаболизира в хомоцистеиновия метаболитен път. Втората избрана за изследването аминокиселина е N-ацетил-L-цистеин и е ацетилирана аминокиселина, с емпирична формула $C_5H_9NO_3S$, която се метаболизира до цистеин и се включва в хомоцистеиновия метаболитен път до синтез на глутатион. Аминокиселината N-ацетил-L-цистеин е доказан мощен антиоксидант, който директно обезврежда свободни радикали и активни форми на кислорода, като $HO\cdot$ и H_2O_2 (АФК). Активните форми на кислорода, резултат от радиолизата на водата, индуцират каскада от реакции, които водят до сериозни увреждания в клетката – единични или двойноверижни разкъсвания в ДНК, замяна на бази във важни, високо експресирани гени, промяна в структурата и функционалната активност на аминокиселини, протеини и ензими [6].

N-ацетил-L-цистеин е много изследвана аминокиселина, с доказана антиоксидантна активност и активност като хелатор на метали [7]. Предшшни научни изследвания проведени с доброволци, приемащи бира в умерено количество, показаха, че се наблюдава намаляване на радиационно-индуцирани

хромозомни аберации в човешки лимфоцити. Така се постави основата на предположението, че бирата има антиоксидантна активност [8]. Една от изследваните аминокиселини триметилглицин (бетаин) е основен бирен компонент и въз основа на анализираната информация, предположихме, че тя също има потенциална антиоксидантна активност. Като естествени метаболити и мощни антиоксиданти, намаляващи вредното въздействие на АФК, беше направено предположение, че двете аминокиселини могат да имат потенциален радиопротективен ефект и да предпазват от развитието на тежки радиационни увреждания.

Цел

Целта на настоящото изследване беше да се определи потенциалната радиопротективна способност на двете природни аминокиселини – N-ацетил-L-цистеин ($C_5H_9NO_3S$) и триметилглицин (бетаин, $(CH_3)_3N+CH_2CO_2^-$), и възможността им да предпазват от развитие или да намалят степента на тежко радиационно поражение.

Материал и методи

Събиране на кръвни проби от човешка периферна кръв и приготвяне на лимфоцитни клетъчни култури

Кръвните проби бяха събрани с погласено официално съгласие от десет донора (на възраст от 18 до 60 години), със съдействието на Отделението по трансфузионна хематология, ВМА – София. 0,5 ml периферна кръв беше култивирана в 12 ml епруветки за суспензионни култури с 4,5 ml хранителна среда RPMI-1640 (Bio-Whittaker, Lonza) и с добавени 20% фетален серум (PAA Laboratories GmbH, Австрия), 2 Mmol L-глутамин (Sigma-Aldrich Co.), 100 U/ml пеницилин (Sigma-Aldrich Co.), 0.1 μ g/ml стрептомицин (Sigma-Aldrich Co.), 50 μ l 2% фитохемаглутинин (Sigma-Aldrich Co.).

Бяха изследвани пет основни експериментални групи:

1. Контролна група от нетретирани и необлъчени човешки лимфоцити;
2. Контролна група от нетретирани и облъчени човешки лимфоцити;
3. Човешки лимфоцити облъчени и третирани с 200 μ g/ml N-ацетил-L-цистеин два часа преди облъчването;
4. Човешки лимфоцити облъчени и третирани с 200 μ g/ml триметилглицин (бетаин) два часа преди облъчването;
5. Човешки лимфоцити облъчени и третирани с 200 μ g/ml N-ацетил-L-цистеин и 200 μ g/ml триметилглицин (бетаин) два часа преди облъчването.

За облъчване на клетъчните култури с 1 Gy погълнатата доза беше използван 137 Cs-източник GOU-3M със съдействието на Институт по физиология на растенията и генетика, БАН. След изтичане на 72 часа инкубация, клетъчните култури

бяха обработени до получаване на фиксирани лимфоцити. От фиксираните лимфоцити бяха приготвени микроскопски препарати за извършване на цитогенетичен анализ за наличие на двуядрени клетки с формирани микронуклеуси.

Обработване на клетъчните култури. Приготвяне на микроскопски препарати и оцветяване

Когато изтече периода на инкубация, клетъчните суспензии бяха прехвърлени в 15 ml епруветки и центрофугирани. Последва отстраняване на супернатантата и ресуспендиране на утайката със затоплен в инкубатора 5 ml калиев хлорид. Калиевият хлорид лизира еритроцитите и спомага за тяхното отстраняване от клетъчната суспензия. След центрофугиране беше отстранена супернатантата, съдържаща еритроцитен лизат. Към утайката беше прибавен фиксиращ разтвор от метанол и оцетна киселина, в съотношение 3:1. Обработката с фиксиращ разтвор се повтори няколко пъти, докато утайката придобие млечнобял цвят. Във всяка епруветка утайката беше ресуспендирана с няколко капки, свеж, фиксиращ разтвор. На предметни стъкла бяха накапани по няколко капки от клетъчните суспензии. Бяха приготвени по две предметни стъкла от всяка култура. Предметните стъкла бяха оставени да изсъхнат на затоплена плоча за една нощ и на другия ден бяха оцветени с 4% разтвор Гимза (Giemsa, Merck, Германия). Всеки препарат беше добре измит с вода и му беше поставено покривно стъкло, подходящо за микроскопски анализ. Микроскопският анализ беше извършен на микроскоп с висока резолюция (Carl Zeiss Jena, x 1000).

Цитогенетичен тест за формиране на микронуклеуси в двуядрени клетки

Един от доказаните в световната практика дозиметрични методи за определяне на радиационно-индуцирано увреждане е микронуклеус тестът. Той е цитогенетичен метод, основан на формирането на малки мембранно-свързани ДНК фрагменти (микронуклеуси) в ядрени клетки, преминали само едно делене на нуклеуса (ядрото) [9]. Този тест е много ефикасен за количествено определяне на цитотоксичност чрез формиране на микронуклеуси (МН-микронуклеус) в цитоплазмата на интерфазни клетки. Те се формират от хромозомни фрагменти или цели хромозоми, които изостават в хода на митотичното делене и не могат да се предвиждат с останалите по време на анафазата [10-11].

Микронуклеусите имат кръгла или овална форма, нямат свързващ мост или обща част с основното ядро. Интензитетът на оцветяване с 4% Гимза е сравнително еднакъв с основното ядро, но понякога може да бъде по-голям или по-малък [12]. Бяха стриктно спазени специалните изисквания одобрени от международната агенция за атомна

енергия (МААЕ, на англ. IAEA) за отчитане, подбор и анализ на формираните в двуядрени клетки микронуклеуси [13]. За избор на двуядрени клетки, включени в преброяването бяха спазени следните критерии:

1. Двете ядра в двуядрената клетка имат свързващ мембранен мост или нуклеоплазмен мост с диаметър $\leq \frac{1}{4}$ от най-големия диаметър на основното ядро;
2. Двете ядра са с почти еднакъв диаметър;
3. Двете ядра не трябва да се прекриват и да са прилепнали едно до друго;
4. Клетките трябва да могат да бъдат преброени под микроскоп;
5. Полиплоидни клетки с повече от две ядра не се включват в броенето.

Бяха приготвени 100 броя микроскопски препарати за цитогенетичен анализ. Всички получени данни бяха съхранени в база данни и обработени с компютърен софтуер за статистически анализ SPSS software (Версия 22). Беше направено графичното представяне на данни за установяване на конкретна зависимост чрез компютърен софтуер MS Office Excel 2013.

Статистически анализ на получените резултати

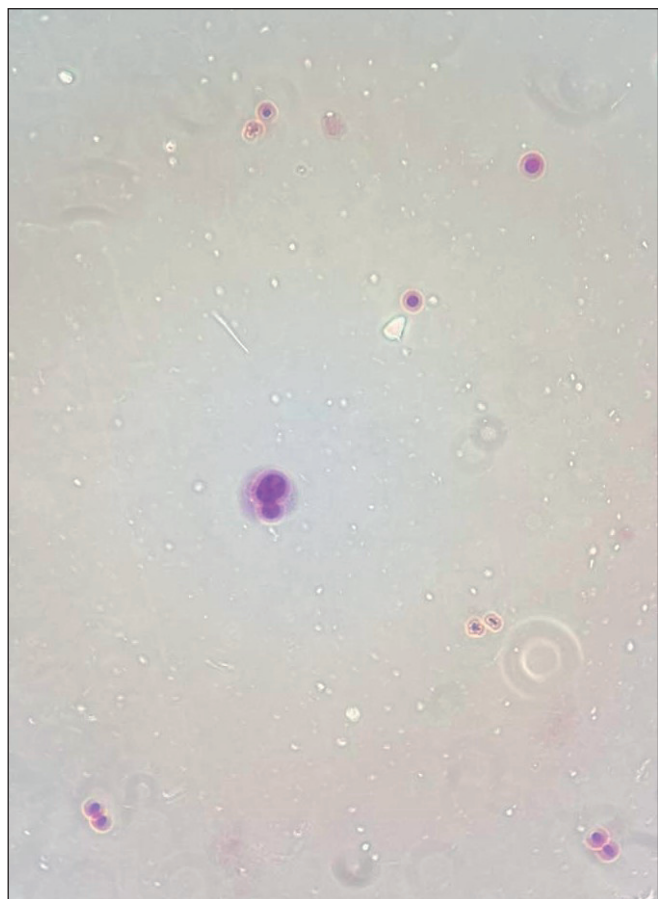
Обработка на резултатите беше извършена на основата на статистическия t-тест, където стандартната грешка се изчисли на база резултатите получени от ANOVA. Резултатите бяха приети за достоверно различаващи се при ниво на значимост $p < 0.05$.

Резултати

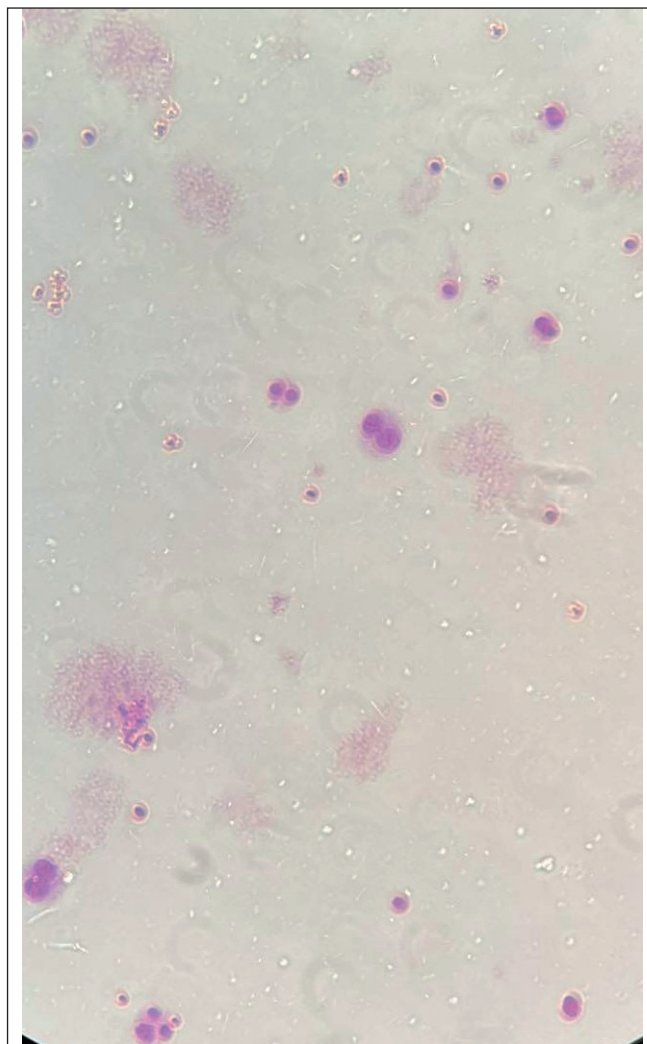
За да определим наличие на потенциален радио-протективен ефект на аминокиселините N-ацетил-L-цистеин и триметилглицин (бетаин) бяха приготвени 100 микроскопски препарати за цитогенетичния микронуклеус тест. Той е рутинен тест, провеждан като алтернатива на цитогенетичното кариотипиране и анализ на метафазни хромозоми [14]. На фиг. 1А и 1Б са показани снимки, като сравнителен анализ на двуядрени клетки в анафаза (нормална митоза) и на двуядрени клетки с микронуклеус, отговарящи на критериите за включване в анализа.

Резултатите от цитогенетичния микронуклеус тест са представени в таблица 1.

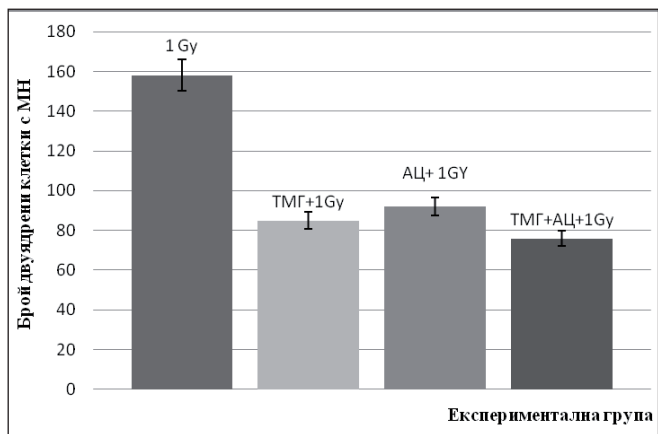
За наличие на двуядрени клетки с микронуклеуси бяха преброени по 500 клетки от всяка изследвана група и беше направен статистически t-тест на получените резултати. Резултатите от изследването за контролните групи корелират с очакваното вредно въздействие на йонизиращата радиация върху лимфоцитните клетки. Резултатите от изследването за групите третирани с радиопротектор превантивно, два часа преди облъчването показаха намаляване на броя на двуядрени клетки с микронуклеуси, в



Фигура 1А. Двухрени клетки в анафаза



Фигура 1Б. Двухрени клетки с микронуклеуси, подходящи за отчитане при цитогенетичен микронуклеус анализ



Фигура 2. Представяне на броя на двухрени клетки с микронуклеуси, отчитани като биологичен маркер за радиационно облъчване, в първични, човешки, лимфоцитни клетъчни култури

сравнение с контролната, облъчена с 1 Gy погълната доза група лимфоцити.

На фиг. 2 се вижда, че броят на изброените двухрени клетки намаляват в реда: нетретирана контрола с облъчване > N-ацетил-L-цистеин > триметилглицин > комбинирано действие > нетретирана контрола без облъчване.

Обсъждане

Превантивното приложение на аминокиселините триметилглицин и N-ацетил-L-цистеин в еднаква

Таблица 1. Резултат от цитогенетичен микронуклеус анализ на изследваните пет експериментални групи

Експериментална група	0 Gy	1 Gy	TMG+1 Gy	AC+1 Gy	TMG+AC+1 Gy
Брой изброени двухрени клетки с микронуклеус при 500 изброени общ брой клетки	23 ± 1	158 ± 3	85 ± 3	92 ± 3	76 ± 3

концентрация в първични, човешки, лимфоцитни клетъчни култури показва снижаване на броя на формираните двуядрени клетки с микронуклеуси. Относно сравняване на намаляването на броя им в третираните с радиопротектор групи, ефектът беше относително еднакъв и най-ясно изразен при третиране на двете изследвани аминокиселини в комбинация. Полученият резултат може да се обясни с евентуален синергичен ефект между двете аминокиселини, изразен в повишаване на радиопротективната им способност срещу вредното въздействие на йонизиращата радиация.

Заклучение

Обобщените резултати от проведените експерименти и анализи показаха, че аминокиселините N-ацетил-L-цистеин и триметилглицин (бетаин) приложени в експериментална моделна система имат добре изразени радиопротективни свойства и могат да бъдат използвани за превенция от развитие или намаляване на степента на остър радиационен синдром или хронични радиационни поражения.

Резултатите от изследването показаха съществено намаляване на радиационно-индуцирани увреждания в ДНК при превантивно третиране с изследваните вещества. Тези резултати откриват нови насоки в тяхното приложение, да бъдат използвани като радиопротектори, които да предпазват от развитието или да намаляват в определена степен последиците от йонизиращата радиация.

Библиография

1. Киндеков И, Василиева В, Аляков М, Николова П, Петрунов П. Биологичен ефект на Resipitum plus върху хемопоетичната форма на остър радиационен синдром. Военна медицина LXI бр.2, 19-22, 2009.
2. Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. J Radiat Res. 2001 Mar;42(1):21-37.
3. Киндеков И, Василиева В, Аляков М, Николова П, Петрунов П. Повлияване на острия радиационен синдром с биологично активни вещества. Военна медицина LXI бр.1, 27-30, 2009.
4. Jagetia GC. Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. J Clin Biochem Nutr. 2007 Mar;40(2):74-81.
5. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia; 6th Edition, 2006.
6. Steel GG, Basic Clinical Radiobiology, 3rd Edition, Arnold, London, 2002.
7. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res. 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.
8. Monobe M, Ando K. Drinking beer reduces radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. J Radiat Res. 2002 Sep;43(3):237-45.
9. Thierens H, Vral A. The micronucleus assay in radiation accidents. Ann Ist Super Sanita. 2009;45(3):260-4.
10. Kirsch-Volders M, Elhajoui A, Cundari E, et al. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. Mutat Res. 1997 Aug 1;392(1-2):19-30.
11. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res. 2000 Nov

20;455(1-2):81-95.

12. Pejchal J, Vasilieva V, Hristozova M, et al. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay/ CBMN cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 2011, vol. 80, p. 28-37.
13. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Manual. Technical reports series, no. 405, Vienna, IAEA, 2001.
14. Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, et al. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). Mutagenesis. 1999 Nov;14(6):569-80.