

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ

Раскоша О.В.¹, Башлыкова Л.А.¹

¹ФГБУН «Институт биологии Коми НЦ УрО РАН», Сыктывкар, e-mail: raskosha@ib.komisc.ru

После хронического γ -облучения мышей линии Af в диапазоне доз 10-30 сГр изучена репродуктивная способность самок и частота нарушений в половых клетках самцов, а также комплекс молекулярно-клеточных параметров в соматических клетках животных: количество клеток с микроядрами (МЯ), доля клеток на стадии апоптоза, митотический индекс (МИ) и уровень двунитевых разрывов ДНК (ДР ДНК). Эффективность хронического воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в малых дозах проявлялась в повышении плодовитости у самок и в изменении стабильности генома клеток, при этом более выраженная ответная реакция была характерна для генома клеток костного мозга – органа с высокой пролиферативной активностью по сравнению со щитовидной железой. Облучение животных в хроническом режиме способствовало изменению чувствительности исследуемых клеток к дополнительному действию химического фактора – уретана. При выявлении биологических эффектов в области малых доз ИИ оптимальным является применение методов исследования на разных уровнях структурной организации, в том числе с учетом различной пролиферативной активности органов.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, малые дозы, хроническое воздействие, уретан, щитовидная железа, костный мозг, микроядра, двунитевые разрывы ДНК, мыши линии Af.

CYTOGENETIC EFFECTS OF LOW DOSES OF IONIZING IRRADIATION CHRONIC EXPOSURE

Raskosha O.V.¹, Bashlykova L.A.¹

¹Institute of Biology, Komi Science Center of RAS, Syktyvkar, e-mail: raskosha@ib.komisc.ru

Reproduction ability and complex of molecular-cell parameters (the frequency of cells with micronuclears MN, the share of cells at apoptosis stage, the mitotic index (MI) and the level of double-strand DNA ruptures (DS DNA)) were studied in mice of Af line in the remote period after chronic γ -irradiation at doses 10-30 cGy. The effectiveness of ionizing irradiation (II) chronic exposure at low doses expressed as an increase in females fertility and changes in genome stability in somatic cells. The more expressed response was found in the genome of the bone marrow – organ with higher proliferative activity in comparison with the thyroid gland. Chronic exposure of mice caused changes in cell sensitivity to the additional chemical factor – urethane. In studies of biological effects of low II doses, it is optimal to use research methods at different organization levels in a view of different proliferative activity of the organs.

Keywords: ionizing irradiation, low doses, chronic exposure, urethane, thyroid gland, bone marrow, micronuclears, DNA double strand breaks, mice of line Af.

Изучение биологических эффектов малых доз ионизирующих излучений (ИИ) является одной из центральных проблем современной радиобиологии, требующей привлечения все новых подходов для ее решения. К настоящему времени установлено, что малые дозы ИИ являются индуктором некоторых генетических и эпигенетических механизмов, при этом зависимость эффекта от дозы облучения носит немонотонный полимодальный характер [1-3]. Появляется все больше данных о том, что ИИ может приводить к нестабильности генома, модифицировать клеточные и тканевые процессы которые способны реализовываться на разных уровнях структурной организации, что в конечном итоге способствует изменению чувствительности организма к действию дополнительных нерадиационных факторов [1; 2; 4]. В рамках этой проблемы особого внимания заслуживают результаты изучения ответных реакций органов и тканей, которые

обладают разной пролиферативной активностью. Для выявления закономерностей действия ИИ в хроническом режиме важным является изучение тканей с низким пролиферативным потенциалом, способных накапливать структурные изменения ДНК [5]. Кроме того, в отдаленные сроки после облучения наблюдаются нарушения, длительно сохраняющиеся и в интенсивно размножающихся тканях, которые, по всей вероятности, также имеют своей первопричиной нестабильность генома облученных клеток [4]. Проявления геномной нестабильности, такие как усиленный мутагенез, нарушение контроля клеточной пролиферации и апоптотической гибели, изменение характера экспрессии генов, могут приводить к стойким морфофункциональным перестройкам на более высоких уровнях организации [6].

Цель исследования – оценить процессы размножения и степень поврежденности генома в соматических клетках мышей линии Af после хронического γ -облучения в диапазоне малых доз (10-30 сГр) и изучить возможность модификации радиационно-индуцированных эффектов после дополнительного химического воздействия.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили на 115 мышах линии Af (на начало экспериментов масса тела 20-25 г), полученных из научной коллекции экспериментальных животных ФГБНУ «ИБ Коми НЦ УрО РАН» (<http://www.ckprf.ru/usu/471933/>). Исследования осуществляли в соответствии с рекомендациями, приведенными в [7]. Животных случайным образом делили на опытные (облученные) и контрольные группы. Мышей опытных групп в возрасте двух-трех месяцев подвергали γ -облучению в течение 29, 56 и 84 суток от двух источников ^{226}Ra (мощность экспозиционной дозы – 150 мкГр/ч), в результате суммарные поглощенные дозы составили 10, 20 и 30 сГр соответственно. Поглощенную дозу облучения определяли по показаниям термолюминесцентных дозиметров (ДТУ-01) с детекторами ДТГ-4 (LiF) на дозиметрической термолюминесцентной установке ДВГ-02ТМ (НПП «Доза», Россия). Контрольные особи находились в идентичных условиях при нормальном уровне радиационного фона (0,15 мкГр/ч). Через четыре месяца после окончания облучения животных выводили из эксперимента путем декапитации. Непосредственно после вскрытия у облученных и контрольных животных взвешивали органы для последующего вычисления индексов селезенки, печени и семенников и брали материал для молекулярных и цитогенетических исследований клеток щитовидной железы, костного мозга и мужских половых клеток. При оценке процессов воспроизводства облученных самцов спаривали с облученными самками (1:2) во всех опытных группах (10, 20 и 30 сГр) и в течение последующих трех месяцев регистрировали показатели, характеризующие интенсивность размножения самок (одновременно с контрольными группами). Выявление модификации радиационно-

индуцированных эффектов после дополнительного химического воздействия осуществляли на животных, облученных в максимальной из используемых доз – 30 сГр. Для этого через четыре месяца после прекращения облучения одной группе животных внутрибрюшинно вводили 10%-ный раствор уретана (этилкарбамат; Sigma-Aldrich, USA) в количестве 1 мг/г массы тела особи (приготовленный на основе изотонического раствора), а второй – аналогичным образом эквивалентное массе тела количество 0,9%-ного раствора NaCl. Эти же манипуляции осуществляли и с контрольными особями. Через 48 часов после химических воздействий всех животных выводили из эксперимента путем декапитации с последующим взятием материала для цитогенетических исследований соматических и половых клеток.

Генетические нарушения в половых клетках самцов определяли по частоте аномальных головок сперматозоидов (АГС) на 500 клеток под световым микроскопом Micros (Austria). В клетках костного мозга и щитовидной железы с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscop A1, (Carl Zeiss, Germany) подсчитывали число клеток с микроядрами (МЯ), в костном мозге на этих же препаратах также анализировали митотический индекс (МИ) и долю клеток, элиминирующих по пути апоптоза (500-1000 клеток на препарат). Методики приготовления препаратов соматических клеток подробно описаны в работе [8]. Двунитевые разрывы ДНК (ДР ДНК) определяли по методу «ДНК-комет» в нейтральной версии рН с применением программы Comet Score Pro (TriTek Corp., USA) с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры AxioCam (Carl Zeiss; Germany). На слайде для разных тканей обрабатывали не менее 50-100 «комет» на одно животное. Рассчитывали среднее значение %TDNA, отражающее процент ДНК в «хвосте кометы», вычисляли частоту встречаемости клеток с неповрежденной и/или низко фрагментированной ДНК (диапазон 0-10%TDNA) и с высоко фрагментированной ДНК (имеющие более 40% ДНК в «хвосте кометы»). Полученные данные подвергали стандартному статистическому анализу с использованием при сравнении различий между опытными и контрольными группами t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в таблице в виде средней арифметической и ошибки средней ($M \pm m$).

Результаты исследования и их обсуждение. Значения массы тела зверьков и индексов разных органов, используемые для определения общего физиологического состояния организма в целом, не показали статистически значимых различий между опытными и контрольными группами животных (табл. 1). Способность к воспроизводству осуществляется под генетическим контролем, и изменения в этом процессе могут свидетельствовать о нарушениях в геноме. Обнаружено, что хроническое воздействие ИИ вызывало статистически значимое увеличение числа рожденных детенышей на самку (при всех дозах облучения) и числа детенышей в помете (20 и 30 сГр) по сравнению с

контрольными данными (табл. 2). Анализ частоты цитогенетических нарушений в половых клетках самцов, выявляемых по количеству АГС, не показал статистически значимых отличий между облученными (при всех дозах) и контрольными животными. По данным литературы, стимуляция интенсивности размножения является компенсацией высокой эмбриональной и постэмбриональной смертности, сокращения продолжительности жизни и других отрицательных эффектов [9]. Результаты проведенного эксперимента позволили выявить повышение на 21,8% и 12,8% смертности детенышей (в первые сутки жизни), рожденных от родителей, облученных в дозах 20 и 30 сГр, чего не наблюдали после дозы 10 сГр и в контроле. Отметим, что до окончания эксперимента (возраст животных 10 мес) и в контрольных и в опытных группах доживало меньше самок, чем самцов (рис.), что можно объяснить дополнительными энергетическими затратами, связанными с вынашиванием и выкармливанием детенышей самками. При этом число самок, доживших до анализируемого срока, было максимальным после облучения в дозе 20 сГр.

Таблица 1

Морфофизиологические показатели мышей линии *Af* после хронического γ -облучения

Группы животных (число животных)	Масса животных, г	Индексы органов		
		селезенка	печень	семенники
Облучение 10 сГр (15)	31,1±1,9	5,1±0,4	44,5±1,8	2,9±0,2
Контроль к 10 сГр (15)	27,7±1,2	5,9±0,5	49,4±1,6	3,4±0,1
Облучение 20 сГр (15)	27,3±0,6	5,3±0,5	46,5±2,3	3,2±0,1
Контроль к 20 сГр (15)	24,4±0,7	7,3±1,5	49,9±3,1	3,3±0,1
Облучение 30 сГр (29)	27,6±1,0	6,4±0,8	44,9±0,9	3,4±0,1
Контроль к 30 сГр (26)	27,3±1,8	6,4±0,8	48,2±2,1	3,2±0,1

Таблица 2

Показатели размножения самок (в течение трех месяцев) и частота АГС у самцов

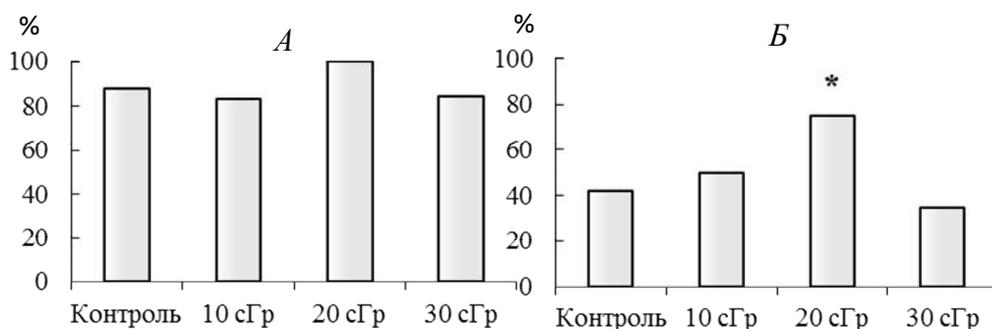
мышей линии *Af* после хронического γ -облучения

Показатель	Вариант эксперимента (поглощенные дозы)			
	Контроль	10 сГр	20 сГр	30 сГр
Число пометов на самку	1,1±0,2	1,4±0,3	1,1±0,2	1,1±0,1
Число детенышей в помете	4,1±0,3	4,7±0,3	6,1±0,8*	6,0±0,4**
Число детенышей на самку	4,3±0,5	6,5±0,9*	6,9±0,4***	6,5±0,6**
Доля самок, участвовавших в размножении (%)	76,2±9,3	87,5±11,6	87,5±11,7	78,3±8,6
Частота АГС (%)	2,6±0,2	3,3±0,4	2,6±0,3	2,2±0,2

Различия с контролем статистически значимы при * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ и *** $p \leq 0,001$.

Анализ радиационно-индуцированных цитогенетических эффектов проведен на клетках костного мозга и щитовидной железы. Костный мозг относится к наиболее радиочувствительным органам с быстрым темпом пролиферации, что позволяет даже при

сравнительно небольшом облучении организма обнаруживать генетические нарушения в его клетках. Щитовидная железа представлена радиочувствительными медленно обновляющимися клеточными популяциями, поэтому изучение состояния клеток этой ткани с помощью молекулярных и цитогенетических методов приобретает особую значимость при проведении исследований в хроническом режиме воздействия факторов.



*Число облученных самцов (А) и самок (Б) в возрасте 10 месяцев (доживших до окончания эксперимента). Различия с контролем статистически значимы при $*p \leq 0,05$*

Полученные результаты показали, что через четыре месяца после хронического γ -облучения мышей в диапазоне доз 10-30 сГр частота клеток с МЯ в анализируемых органах была в пределах значений, характерных для контрольных животных (табл. 3). В ответ на действие ИИ в костном мозге было обнаружено статистически значимое понижение относительно нормы элиминации клеток по пути апоптоза (во всех опытных группах) и уровня МИ (после доз 10 и 20 сГр). Замедление клеточного цикла, о котором косвенно свидетельствует снижение МИ, возможно, обусловлено его остановкой в точках контроля целостности ДНК, необходимой для увеличения продолжительности и эффективности репарации генетических повреждений [2]. Кроме того, с помощью метода «ДНК-комет» в обоих органах после радиационного воздействия обнаружено изменение степени фрагментации ДНК (табл. 4). В костном мозге животных, подвергнутых радиационному воздействию в дозе 30 сГр, выявлено статистически значимое понижение, по сравнению с контролем, среднего значения %TDNA (ДР ДНК). Это произошло вследствие увеличения более чем в два раза числа неповрежденных клеток (0-10%TDNA; $p \leq 0,01$), что может свидетельствовать об активации систем репарации ДНК в ответ на действие ИИ в этой дозе. Средние значения %TDNA в костном мозге мышей, облученных в дозах 10 и 20 сГр, были в пределах нормы, однако ранжирование клеток по классам в зависимости от содержания ДНК в «хвосте кометы» позволило выявить статистически значимые различия с контролем ($p \leq 0,001$) и в этих опытных группах; после облучения животных в дозе 10 сГр в костном мозге было снижено в 1,7 раза количество клеток с неповрежденной ДНК (0-10%TDNA), а

после дозы 20 сГр уменьшалась в 1,8 раза частота встречаемости клеток с высоко фрагментированной ДНК (41-100%TDNA). В клетках фолликулярного эпителия щитовидной железы также обнаружены радиационно-индуцированные генетические изменения, которые проявлялись в статистически значимом снижении относительно нормы частоты встречаемости клеток с высоко фрагментированной ДНК у животных, облученных в дозах 20 и 30 сГр, что повлияло на средние значения содержания %ДНК в «хвосте кометы» (%TDNA при 20 сГр; $p \leq 0,05$). Число клеток, в которых ДНК находилась вблизи «головы кометы» (0-10%TDNA), не выходило за пределы контроля во всех опытных группах.

Таблица 3

Цитогенетические показатели клеток костного мозга и щитовидной железы мышей линии *Af* после хронического γ -облучения и дополнительного введения уретана (%)

Группы животных	Щитовидная железа		Костный мозг		
	МЯ	МЯ	МИ	Апоптоз	
Контроль	8,0±1,5	22,7±1,2	6,9±0,6	8,1±0,6	
10 сГр	4,5±1,2	21,8±2,1	4,2±0,6*	1,6±0,5***	
20 сГр	6,8±1,2	21,9±1,7	4,1±0,7*	2,7±0,6***	
30 сГр	9,0±1,0	21,4±0,5	7,3±0,3	6,2±0,2*	
Уретан	7,8±1,3	21,8±0,5	3,9±1,2*	11,0±1,5*	
30 сГр+Уретан	7,3±1,4	24,0±1,2 ^v	9,4±0,7 ^v	4,6±0,2 ^v	

Здесь и в табл. 4. статистически значимы отличия между опытными и контрольной группами при * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ и *** $p \leq 0,001$; между группами «30 сГр+Уретан» и «30 сГр» при ^v $p \leq 0,05$.

Таблица 4

Результаты метода «ДНК-комет», проведенного на соматических клетках мышей линии *Af* после хронического γ -облучения и дополнительного введения уретана

Группы животных	Щитовидная железа			Костный мозг		
	%TDNA	0-10% TDNA	41-100% TDNA	%TDNA	0-10% TDNA	41-100% TDNA
Контроль	31,7±1,0	18,6±1,1	33,3±1,3	23,3±0,3	13,1±0,8	5,7±0,6
10 сГр	31,9±1,0	19,3±1,9	34,7±2,3	24,6±0,4	7,6±1,1***	4,0±0,8
20 сГр	27,7±0,8*	19,7±1,8	17,4±1,7***	23,2±0,4	13,7±1,4	3,1±0,7**
30 сГр	30,4±1,0	16,8±1,8	21,3±2,2***	19,6±0,5*	27,9±1,8***	6,3±1,0
Уретан	30,6±0,9	14,1±1,6*	27,1±2,0*	17,8±0,7	39,4±1,8***	8,4±0,6*
30 сГр+Уретан	31,9±1,0	11,6±1,8 ^v	28,7±2,5 ^v	29,7±0,8 ^v	17,7±0,8 ^v	28,5±0,6 ^v

% TDNA – ДР ДНК по средним значениям процента ДНК в «хвосте кометы»;

TDNA – 0-10%TDNA – доля клеток с неповрежденной и/или низко фрагментированной ДНК;

41-100%TDNA – доля клеток с высоко фрагментированной ДНК.

Изучение спонтанного и радиационно-индуцированного уровней повреждений генома клеток костного мозга и щитовидной железы животных позволило дать оценку последствий с учетом не только радиационного фактора (30 сГр), но и реакции соматических клеток на

дополнительное действие химического фактора – уретана (1 мг/г массы тела животного). Тест с химической нагрузкой показал различия в ответной реакции клеток анализируемых органов между контрольными и облученными животными (табл. 3 и 4). В костном мозге мышцей контрольной группы через двое суток после воздействия уретана статистически значимо снижался МИ, возрастали доля апоптозных клеток и значения низко и высоко фрагментированной ДНК. Это свидетельствует в пользу того, что в ответ на действие канцерогена в клетках костного мозга контрольных животных в целях защиты целостности генома происходит усиление таких процессов, как репарация ДНК и элиминация клеток с нерепарируемыми повреждениями ДНК. В итоге средний уровень ДР ДНК (%TDNA) и частота встречаемости клеток с МЯ в костном мозге сохранялись в пределах спонтанного уровня. У облученных животных после воздействия уретана изменения митотической активности и апоптоза происходили в противоположных направлениях по сравнению с контрольными значениями – МИ возрастал, число апоптозных клеток снижалось. Также у этих животных в костном мозге отмечено увеличение ($p \leq 0,05$) доли клеток с МЯ и с ДР ДНК, что указывает на проявление нестабильности генома.

В щитовидной железе как у облученных, так и у контрольных групп животных уретановая интоксикация по истечении двух суток не повлияла на частоту встречаемости клеток с МЯ и средний уровень содержания ДНК в хвосте «кометы» (%TDNA). Различие между этими группами проявлялось в доле клеток с высоко фрагментированной ДНК (41-100%TDNA); у контрольных мышцей после воздействия уретана отмечали снижение значения этого показателя, тогда как у предварительно облученных особей, наоборот, повышение, что свидетельствует об изменении ответной реакции клеток щитовидной железы у облученных животных. Следует отметить, что доля клеток с неповрежденной ДНК (0-10%TDNA) в обеих сравниваемых группах была статистически значимо ниже, чем до химического воздействия.

Заключение. Обнаружено, что эффективность хронического воздействия ИИ в малых дозах (10, 20 и 30 сГр) при внешнем физиологическом благополучии мышцей проявлялась в повышении показателей плодовитости у самок и в изменении стабильности генома соматических клеток. Результаты цитогенетического анализа позволили выявить более выраженные радиационно-индуцированные изменения в клетках костного мозга, обладающего высокой пролиферативной активностью, по сравнению со щитовидной железой. Хроническое облучение способствовало изменению чувствительности клеток животных к действию дополнительного химического фактора – уретана. При выявлении биологических эффектов в области малых доз ИИ оптимальным является применение методов исследования на разных уровнях структурной организации, в том числе с учетом пролиферативной активности органов.

Список литературы

1. Бурлакова Е.Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е.Б. Бурлакова А.А. Конрадов, Е.Л. Мальцева // Химическая физика. – 2003. – Т. 22. – №. 2. – С. 21-40.
2. Жижина Г.П. Влияние малых доз низкоинтенсивной ионизирующей радиации на структуру и функции ДНК // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. – Т. 51. – № 2. – С. 218-228.
3. Кузнецова Е.А. Индукция редко- и плотноионизирующими излучениями повреждений ДНК в лейкоцитах крови и цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей и их потомков / Е.А. Кузнецова, С.И. Заичкина, Н.П. Сирота и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54. – № 4. – С. 341-349.
4. Воробцова И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46. – № 4. – С. 441-446.
5. Бычковская И.Б. Немутагенные немишенные радиационные эффекты. Наследуемое снижение жизнеспособности клеток, индуцированное лучевыми воздействиями в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53. – № 3. – С. 246-258.
6. Проблемы радиационной геронтологии / под ред. С.Н. Александрова. – М.: Атомиздат, 1978. - Сер.: Современные проблемы радиобиологии. – Т. 7. - 208 с.
7. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». – М.: Стандартинформ, 2015. - 16 с.
8. Раскоша О.В. Генетические эффекты в соматических клетках мышей, подвергнутых хроническому гамма-облучению в малых дозах, и у их потомков / О.В. Раскоша, Л.А. Башлыкова // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2016. – № 4 (28). – С. 55-59.
9. Таскаев А.И. Эколого-генетический мониторинг мышевидных грызунов из популяций, подвергшихся хроническому облучению / А.И. Таскаев, Л.А. Башлыкова, В.Г. Зайнуллин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50. – № 5. – С. 560-571.