

Н.М. РЯБЧЕНКО, Н.К. РОДІОНОВА, І.С. СИЧЕВСЬКА,
І.І. МУЗАЛЬОВ, В.М. МИХАЙЛЕНКО, М.О. ДРУЖИНА

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

E-mail: nauka@onconet.kiev.ua

E-mail: nryabchenko@ukr.net

ГЕНОТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ РАДІАЦІЇ ТА ГІПЕРТЕРМІЇ У ЛІНІЙНИХ МИШЕЙ З РІЗНОЮ РАДІАЦІЙНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ



Досліджено особливості процесів репарації пошкоджень ДНК та їх реалізації на хромосомному рівні в клітинах кісткового мозку експериментальних тварин (мишей ліній СВА і СЗН) з різною радіаційною чутливістю. Показано, що радіомодифікуюча ефективність помірної гіпертермії (ГТ) вища у тварин радіорезистентної лінії. При цьому спостерігалась інтенсивна елімінація хромосомних пошкоджень, рівень яких у віддалені терміни спостереження практично не відрізнявся від контрольних значень. У мишей більш радіочутливої лінії спостерігалось довготривале потенціювання пошкоджуючої дії опромінення на хромосомному рівні за додаткової дії ГТ.

© Н.М. РЯБЧЕНКО, Н.К. РОДІОНОВА,
І.С. СИЧЕВСЬКА, І.І. МУЗАЛЬОВ, В.М. МИХАЙЛЕНКО,
М.О. ДРУЖИНА, 2013

Вступ. Відомо, що гіпертермія (ГТ) є ефективним радіомодифікуючим агентом, а її радіосенсибілізуючий ефект в злоякісних тканинах залишається одним із основних напрямків досліджень в клінічній радіології [1, 2]. Літературні дані свідчать, що характер і ступінь генотоксичних ефектів комбінованої дії радіації і ГТ, а саме потенціювання, адитивність або ж синергізм, залежать від багатьох параметрів, в першу чергу від застосованих способів та характеристик сумісної дії і біологічних критеріїв оцінки. Вважають, що термічна радіосенсибілізація найімовірніше зумовлена впливом на процеси репарації радіаційно індукованих пошкоджень ДНК та підвищенням частки летально пошкоджених клітин [3]. Дослідження останніх років свідчать, що гіпертермічна дія може супроводжуватися формуванням gH2AX локусів та експресією протеїнів розпізнавання двониткових розривів (ДР) ДНК Nbs1 та Mre11 протягом S, G1, G2 фаз клітинного циклу, аналогічно до дії іонізуючої радіації [4]. Таким чином, при комбінованій дії опромінення та ГТ, з одного боку, підвищується ймовірність додаткової індукції пошкоджень ДНК, а з іншої – порушуються процеси репарації радіаційно-індукованих пошкоджень, підвищується частка помилкової репарації. Показано, що кількість ДР та помилково репарованих ДР ДНК за дії підвищеної температури (45 °С впродовж 20 хв) до опромінення культур фібробластів людини зростала на 13 та 51 % відповідно [5]. Нерепаровані або помилково репаровані ДР ДНК у свою чергу призводять до підвищеного рівня аберацій хромосом та втрати гетерозиготності, що є потенційно летальними подіями для клітини. Подібні результати одержано для різних режимів термічного впливу та опромінення, за дії радіації різної якості та культур нормальних і злоякісних клітин [6, 7]. Ефективність термічної дії виявилась набагато вищою в клітинах, мутантних за генами *Ku80*, *XRCC3*, що беруть участь в процесах репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації та ексцизійної репарації нуклеотидів [8].

Повідомляється і про радіозахисний вплив ГТ на культуру клітин фібробластів мишей. Встановлено, що попередня до опромінення термічна дія (43 °С, 30 хв) може викликати індукцію білків термічного шоку, які, на дум-

ку авторів [9], мають радіозахисні властивості та забезпечують підвищення виживаності клітин після опромінення. Навпаки, інші дослідники не виявили подібних ефектів, і тому радіозахисна функція білків термічного шоку залишається до кінця не доведеною та дискусійною [10, 11].

В останні роки встановлено, що підвищена чутливість клітини до дії іонізуючої радіації є генетично детермінованою ознакою, яка визначається, насамперед, інтенсивністю та ефективністю клітинного контролю за процесами розпізнавання, репарації та елімінації пошкоджень ДНК. Як зазначено вище, процеси репарації ДНК мають вирішальне значення не тільки у формуванні радіаційної чутливості, а й лежать в основі механізмів реалізації модифікуючої дії радіопротекторів та генотоксичної дії радіосенсибілізаторів на клітину та організм в цілому. Тому дослідження генотоксичних ефектів комбінованої дії іонізуючого випромінювання та радіомодифікаторів в залежності від ступеня радіаційної чутливості організму є актуальним фундаментальним та практичним завданням.

В роботі досліджено динаміку репарації ДНК та формування цитогенетичних ефектів в клітинах кісткового мозку (ККМ) мишей з різною радіаційною чутливістю за послідовної дії гострого опромінення та помірної ГТ.

Матеріали і методи. Робота виконана на лінійних мишах СВА і СЗН розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Всі досліди проводились згідно з вимогами біоетичного ставлення до лабораторних тварин. З кожної лінії були сформовані експериментальні групи тварин по п'ять тварин в кожній: інтактні, або група контролю, опромінені, група з гіпертермічним впливом, опромінені з наступною дією ГТ.

Рентгенівське опромінення здійснювали на апараті РУМ-17: напруга на трубці – 200 кВ, струм – 10 мА, фільтр – 0,5 мм Cu + 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань – 50 см, потужність експозиційної дози випромінювання – 0,89 Гр/хв, поглинута доза – 1,0 Гр.

Мишей піддавали дії підвищеної температури у вентильованому, попередньо прогрі-

тому термостаті при 42 °С протягом 10 хв безпосередньо після опромінення. Після цього тварин обстежували через 1 год, через 7 і 30 діб.

Препарати метафазних хромосом ККМ мишей готували за загальноприйнятою методикою [12]. Колхіцин вводили у черевну порожнину мишей за 1,5 год до початку експериментів із розрахунку 5 мкг на 1 г маси тіла при концентрації робочого розчину 1 мг/мл. Гіпотонічну обробку клітин, одержаних із стегнової кістки, здійснювали 0,56%-ним розчином КСІ впродовж 20 хв при 37 °С, після чого клітини фіксували у суміші етилового спирту та льодяної оцтової кислоти (3:1), розкапували на предметні скельця та фарбували 10%-ним розчином фарбника Гімза. Препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа та враховували наступні показники дестабілізації хромосомного апарату: частоту метафаз з абераціями, загальну частоту аберацій хромосом та частоту аберацій хроматидного та хромосомного типів. Від кожної тварини аналізували не менше 150 метафаз. Всього проаналізовано близько 16 000 метафаз.

Фактор зміни дози (ФЗД) іонізуючого випромінювання за допомогою гіпертермії обчислювали за формулою

$$F = \frac{RM - M}{R - C},$$

де RM – рівень аберацій хромосом за дії опромінення та ГТ; M – рівень аберацій хромосом за дії ГТ; R – рівень аберацій хромосом, індукованих опроміненням; C – рівень аберацій хромосом в інтактних клітинах.

Ступінь пошкодження ДНК визначали методом гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод «Комет») [14, 15]. Суспензію клітин у фосфатно-сольовому буфері ($0,4 \cdot 10^6$ – $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл) лізували, піддавали лужній денатурації та електрофорезу. Слайди фарбували розчином акридинового оранжевого та досліджували під мікроскопом при довжинах хвиль збудження та реєстрації 490 і 530 нм відповідно. Зображення комет отримували за допомогою CCD-камери («Webbers», США) та аналізували з використанням програми Comet Score («TriTek Corp», США). В кожному слайді аналізували 100 комет без накладання хвос-

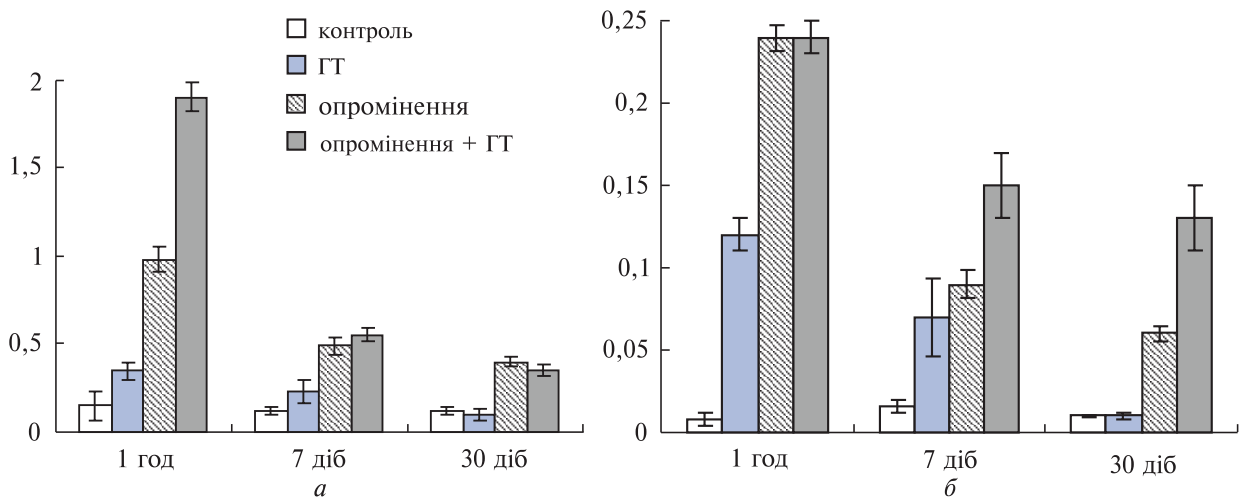


Рис. 1. Індекс кількості пошкоджень ДНК (по вертикалі, $\times 10^9$ Да) після дії стрес-агентів в ККМ мишей лінії СВА (а) та СЗН (б) у різні терміни спостереження

тів. Визначали такі параметри: «% ДНК в голові комети», «% ДНК в хвості комети», «момент хвоста комети», що дозволяє підвищувати відтворюваність результатів та співставляти отримані результати з даними інших досліджень. Кінцеву оцінку генотоксичного ефекту проводили, визначаючи індекс кількості пошкоджень в ДНК.

Статистичну обробку даних виконували з використанням критерію Ст'юдента для незалежних виборок за допомогою пакета статистичної програми StatSoft Statistica 6,0. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез дослідження становив 0,05. Кореляцію між результатами двох тестів визначали за допомогою коефіцієнта кореляції Персона (r).

Результати досліджень та їх обговорення. Лінійні миші СВА та СЗН є зручною моделлю для оцінки радіаційно індукованої нестабільності геному, канцерогенезу та специфічності дії радіомодифікаторів завдяки генетично детермінованій схильності до різної радіаційної чутливості клітин, що виявляється в істотній різниці показників виживаності. Так, за літературними даними, $LD_{50/30}$ лінії СЗН становить 6,8 Гр, тоді як для СВА – 9,3 Гр. При цьому вихід спонтанних пухлин молочної залози у тварин лінії СЗН в середньому складає 95 %, тоді як у тварин лінії СВА – до 22 % [15–18]. Для оцінки *in*

in vivo дестабілізації геному ККМ експериментальних мишей, індукованої дією радіації та підвищеної температури, нами були застосовані методи, що широко використовуються в сучасному біологічному моніторингу генотоксичних факторів: метод ДНК-комет та оцінка частоти аберацій хромосом в різні терміни спостереження.

Результати дослідження ступеня пошкодження ДНК представлено на рис. 1, а, б. Індекс пошкоджуваності ДНК в інтактних клітинах достовірно не змінювався протягом усього терміну експерименту. GT сама по собі викликала достовірне підвищення рівня пошкодження ДНК в клітинах мишей лінії СЗН, зафіксоване через 1 год після експерименту (рівень значущості розбіжностей $P = 0,04$). Одержані дані свідчать, що інтенсивність репарації індукованих стрес-агентами (опроміненням та GT) пошкоджень ДНК в обох лініях тварин відрізняється. У мишей лінії СВА, як видно, процеси репарації відбуваються значно інтенсивніше і практично завершуються через 1 год після дії підвищеної температури. На 7-му добу підвищений рівень пошкоджень ДНК, індукованих опроміненням, GT та їхньою комбінацією, у порівнянні з контролем зберігався в клітинах більш радіочутливої лінії СЗН, тоді як у тварин лінії СВА ця різниця була недостовірною ($P = 0,77$). Аналогічні результати одержано

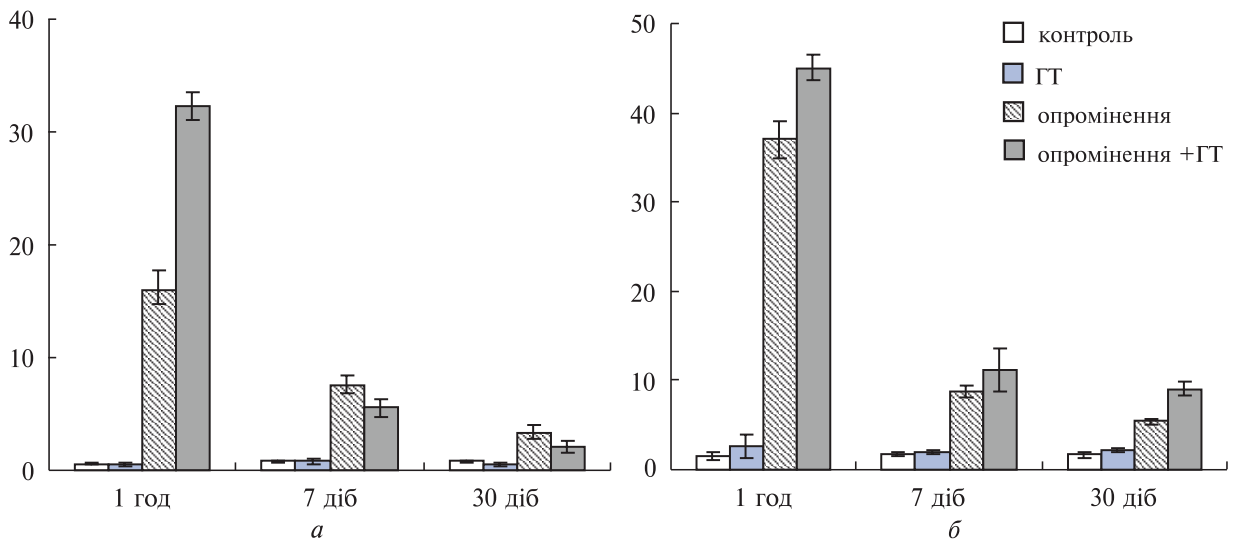


Рис. 2. Частота аберацій хромосом після дії стрес-агентів на 100 метафаз (по вертикалі) в ККМ мишей ліній СВА (а) та СЗН (б) у різні терміни спостереження

і на 30-ту добу досліджу: рівень пошкоджень ДНК достовірно перевищував контрольні значення при опроміненні та додатковій дії ГТ у групі більш радіочутливих тварин СЗН ($P = 0,45$).

Ступінь реалізації пошкоджень геному оцінювали на хромосомному рівні за допомогою аналізу частоти та спектра аберацій хромосом в ККМ. Відомо, що кістковий мозок є критичним органом, стан якого зумовлює ступінь радіаційного пошкодження та ймовірність загибелі опроміненого організму. В дослідженнях по виявленню мутагенних властивостей факторів довкілля рівень аберацій хромосом в ККМ – один з найчутливіших показників генотоксичної дії різних агентів та здатності кровотворної тканини до регенерації після дії генотоксикантів [19, 20].

При цитогенетичному обстеженні через 1 год після одноразового опромінення тварин в дозі 1,0 Гр спостерігалось істотне збільшення частоти аберацій хромосом – у 20 разів в ККМ мишей лінії СВА та у 23 рази – лінії СЗН в порівнянні з показниками групи інтактного контролю ($P = 0,0098$ та $0,0087$ відповідно) (рис. 2, а, б). Спектр аберацій хромосом практично не відрізнявся в обох ліній тварин і складався переважно з одиночних фрагментів (95,6 % у мишей СЗН, 98 % – у мишей СВА), парних фрагментів (3 і 2 %

відповідно) та хроматидних обмінів (1,4 % у лінії СЗН).

Через 7 діб внаслідок елімінації пошкоджених клітин під час процесів поділу ККМ частота аберацій хроматидного типу істотно знизилась у тварин обох ліній, проте загальний рівень аберацій хромосом був достовірно вищий, ніж у контрольних тварин. Підвищений рівень аберацій хромосом зберігався в опроміненних ККМ і на 30-ту добу, причому для лінії СЗН він був вищим і складав $5,4 \pm 0,6$, для лінії СВА – $3,3 \pm 0,8$ ($P = 0,024$ та $0,044$ відповідно).

Цитогенетичне обстеження мишей лінії СЗН через 1 год після дії ГТ (10 хв при 42°C) виявило незначне, проте достовірне ($P = 0,040$) підвищення частоти аберацій хромосом, яка на 7-му добу не відрізнялась від контрольного рівня. За дії ГТ в ККМ тварин лінії СВА, на відміну від лінії СЗН, не виявлено підвищеного рівня структурних пошкоджень хромосом як у ранні, так і у віддалені терміни.

Найвищий радіомодифікуючий ефект ГТ зареєстрований в ККМ радіорезистентної лінії мишей СВА через 1 год після дії радіації. Значення ФЗД в цій групі становило 2,06, в групі СЗН – 1,17. Проте вже на 7-му добу і в подальшому рівень цитогенетичних пошкоджень в групі тварин лінії СЗН був вищим. В

цій групі спостерігали збереження ефекту посилення променевого ураження за дії ГТ і на 30-ту добу, що зумовило зростання величини ФЗД (1,86), тоді як у мишей лінії СВА воно знизилось до 0,6. Рівень значущості відмінностей між контрольними значеннями та відповідними показниками в цій групі становив 0,02.

Таким чином, на хромосомному рівні в ранні терміни після комбінованої дії іонізуючої радіації та ГТ зареєстровано найвищий радіомодифікуючий ефект у ККМ більш радіорезистентної лінії мишей СВА, що супроводжувалось інтенсивною елімінацією пошкоджених клітин протягом періоду обстеження тварин. У мишей більш радіочутливої лінії спостерігалось довготривале потенціювання пошкоджуючої дії опромінення на хромосомному рівні в ККМ за додаткової дії ГТ.

Поєднання метода «Комет» з метафазним аналізом хромосом дозволило оцінити не тільки первинний рівень розривів ДНК, динаміку репарації, а також ступінь їхньої реалізації на хромосомному рівні у віддалені терміни після дії стрес-агентів. Порівняння результатів двох тестів виявило високу позитивну кореляцію показників рівня пошкоджень ДНК та аберацій хромосом в ККМ в усі терміни спостереження для обох груп ($r = 0,79 \div 0,98$). Одержані результати свідчать, що інтенсивність процесів репарації лежить як в основі формування нестабільності хромосомного апарату клітини, так і в розбіжностях показників радіочутливості клітин в обстежених групах.

Таким чином, інтенсивність репарації пошкоджень ДНК та їх елімінації в процесі поділу клітин в групах тварин з різною радіаційною чутливістю істотно відрізнялась. Найвищий цитогенетичний радіомодифікуючий ефект ГТ зареєстровано в ККМ радіорезистентної лінії мишей СВА через 1 год після дії радіації, проте у віддалені терміни спостереження рівень цитогенетичних пошкоджень у групі радіочутливих тварин лінії СЗН був значно вищим, що можна пояснити більш інтенсивною елімінацією летально пошкоджених клітин в радіорезистентній групі. Можна припустити, що підвищена температура у поєднанні з опроміненням в ранні терміни

посилює генотоксичну дію радіації, одночасно стимулюючи захисно-компенсаторні реакції організму радіорезистентних тварин, що у віддалені терміни проявляється в зниженні кількості клітин з пошкодженнями ДНК. Проведені експерименти дозволяють розширити уявлення про характер формування генотоксичних ефектів опромінення та їх модифікації в залежності від ступеня радіаційної чутливості біологічного об'єкта, зумовленої інтенсивністю процесів репарації пошкоджень ДНК, та термінів спостереження.

N.M. Ryabchenko, N.K. Rodionova, I.S. Sychevska, I.I. Musalev, V.M. Mikhaïlenko, M.O. Druzhyina

GENOTOXIC EFFECTS OF RADIATION AND HYPERTHERMIA IN LINEAR MICE WITH DIFFERENT RADIATION SENSITIVITY

Peculiarities of repair of DNA injuries induced by radiation and hyperthermia and their realization on chromosomal level in bone marrow cells of experimental animals with different radiation sensitivity were studied. It is shown that radiomodification efficiency of mild hyperthermia is higher for radioresistant animals. More intensive elimination of chromosomal injuries the level of which in remote terms of examination corresponds to the control value, is observed. In the group of animals with higher radiation sensitivity prolonged thermal potentiation of radiation effects on chromosomal level is determined.

Н.Н. Рябченко, Н.К. Родионова, И.С. Сычевская, И.И. Музалев, В.М. Михайленко, Н.А. Дружина

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАДИАЦИИ И ГИПЕРТЕРМИИ У ЛИНЕЙНЫХ МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ РАДИАЦИОННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Исследованы особенности процессов репарации поврежденных ДНК, индуцированных радиацией и гипертермией, а также их реализации на хромосомном уровне клеток костного мозга мышей линий СВА и СЗН с различной радиационной чувствительностью. Показано, что радиомодифицирующая эффективность мягкой гипертермии выше у животных радиорезистентной линии. При этом наблюдается более интенсивная элиминация хромосомных повреждений, уровень которых в отдаленные сроки наблюдения практически не отличался от контрольных значений. У мышей более радиочувствительной линии наблюдалось длительное потенцирование повреждающего действия радиации на хромосомном уровне с помощью гипертермии.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Falk M.H., Issels R.D.* Hyperthermia in oncology // *Int. J. Hyperthermia.* – 2001. – **17**, № 1. – P. 1–18.
2. *Sneed P.K., Phillips T.L.* Combining hyperthermia and radiation: how beneficial? // *Oncology.* – 1991. – № 3. – P. 99–108.
3. *Seno J. D., Dynlacht J.R.* Intracellular redistribution and modification of proteins of the Mre11/Rad50/Nbs1 DNA repair complex following irradiation and heat-shock // *J. Cell Physiol.* – 2004. – № 199. – P. 157–170.
4. *Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H.* The cellular and molecular basis of hyperthermia // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2002. – **43**, № 1. – P. 33–56.
5. *El-Awady R.A., Dikomey E., Dahm-Daphi J.* Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements // *Nucl. Acid Res.* – 2001. – **29**, № 9. – P. 1960–1966.
6. *Takahashi A., Matsumoto H., Nagayama K., Kitano M., Hirose S., Tanaka H., Mori E., Yamakawa N., Yasumoto J., Yuki K., Ohnishi K., Ohnishi T.* Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing // *Cancer Res.* – 2004. – № 64. – P. 8839–8845.
7. *Kampinga H.H., Dikomey E.* Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2001. – № 77. – P. 399–408.
8. *Raaphorst G.P., LeBlanc J.M., Li L.F., Yang D.P.* Hyperthermia responses in cell lines with normal and deficient DNA repairs systems // *J. Thermal Biol.* – 2005. – № 30. – P. 478–484.
9. *Малютина Я.В., Кабаков А.Е.* Предрадиационная индукция белков теплового шока повышает клеточную радиорезистентность // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2007. – **47**, № 3. – С. 273–279.
10. *Fortin A., Raybaud-Diogene H., Tetu B.* Overexpression of the 27 KDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2000. – **46**, № 5. – P. 1259–1266.
11. *Ekedahl J., Joseph B., Marchetti P.* Heat shock protein 72 does not modulate ionizing radiation-induced apoptosis in U1810 non-small cell lung carcinoma cells // *Cancer Biol. Ther.* – 2003. – **2**, № 6. – P. 663–669.
12. *Galloway S.M., Aardema M.J., Ishidate M.Jr., Ivett J.L., Kirkland D.J., Morita T., Mosesso P., Sofumi T.* Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations // *Mutat. Res.* – 1994. – **312**. – P. 241–261.
13. *Петин В.Г., Комаров В.П.* Количественное описание модификации радиочувствительности. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 192 с.
14. *Olive P.L.* The Comet assay : An overview of techniques // *Meth. Mol. Biol.* – 2001. – № 203. – P. 179–194.
15. *Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay // *Mutagenesis.* – 2003. – **18**, № 1. – P. 45–51.
16. *Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.* – 1998. – № 175. – P. 184–191.
17. *Bond V.P.* Radiation mortality in different mammalian species // *Comparative Cellular and Species Radiosensitivity / Eds V.P. Bond, T. Sugahara.* – Tokyo, 1996. – P. 1–18.
18. *Григоркина Е.Б.* Биологические характеристики и экологические факторы, определяющие радиорезистентность мелких млекопитающих // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2004. – **44**, № 3. – С. 245–250.
19. *Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R., Waters M.D., Aitio A.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans // *Mutat. Res.* – 2000. – **463**. – P. 111–172.
20. *OECD TG No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing, Paris, 1998.*

Надійшла 22.07.11