

P19-2001-184

Н.Л.Шмакова, Т.А.Фадеева, Е.А.Насонова,
Е.А.Красавин, А.В.Рзянина

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ В КЛЕТКАХ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ: АНАЛИЗ ФЕНОМЕНА
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
И ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоз экология»

Оценка биологического действия малых доз ионизирующего излучения чрезвычайно важна для прогнозирования генетического и канцерогенного риска облучения. В настоящее время такого рода прогнозирование осуществляется путем экстраполяции эффектов высоких доз в область низких доз и результаты оценок зависят от модели, положенной в основу экстраполяции. Характерным примером противоречий, возникающих по указанной выше причине, является прогнозирование последствий облучения большой популяции людей в результате Чернобыльской аварии: Гофман [1] предсказывает 300 тыс. летальных исходов от злокачественных опухолей, Луки [2] - снижение смертности от спонтанных раков на 20 тыс. случаев.

Беспороговая линейная концепция, предполагающая опасность любого, даже самого малого превышения естественного радиационного фона, является общепризнанной и положена в основу рекомендаций МКРЗ [3,4]. Однако экспериментальные данные, полученные в последние годы, вступают в явное противоречие с этой концепцией и свидетельствуют о неправомерности линейной экстраполяции эффектов высоких доз на низкие.

При оценке эффектов биологического действия малых доз излучения, как правило, регистрируется частота цитогенетических повреждений, а именно, индукция хромосомных перестроек и микроядер [5-10], злокачественная трансформация [11]. Использование прецизионных методов [12] позволило точно оценить выживаемость клеток млекопитающих в диапазоне 0-1 Гр [13,14], что было невозможно при применении метода Пака и Маркуса [15]. По всем перечисленным критериям показана сложная нелинейная зависимость доза-эффект в области малых доз, характеризующаяся наличием дозозависимого участка или обратной зависимости от дозы в диапазоне 0-1 Гр. При этом, как правило, отмечается более высокая эффективность воздействия на единицу дозы при малых дозах, чем при облучении высокими дозами. Гиперчувствительность (ГЧ) при малых дозах особенно убедительно продемонстрирована по критерию выживаемости более чем 26 клеточных линий человека [13,14,16,17].

Наличие ГЧ при малых дозах может быть объяснено несколькими

причинами. Первое возможное объяснение ГЧ - это наличие генетически или фенотипически обусловленной субпопуляции радиочувствительных клеток. Против присутствия генетически стабильной чувствительной популяции свидетельствует тот факт, что на клетках *in vitro* через 24 ч после облучения дозой 1 Гр ГЧ выявляется в такой же степени, как и на клетках без предоблучения [13]. Вряд ли можно ожидать столь быстрого восстановления радиочувствительной фракции после ее "выбивания" предварительным облучением в дозе 1 Гр.

Наличие фенотипически обусловленной радиочувствительной фракции может быть связано с распределением асинхронной популяции по клеточному цикл, и, т. о., ГЧ может являться следствием гибели при малых дозах клеток, находящихся в радиочувствительной фазе цикла. Однако математическая модель, сконструированная исходя из предположения о наличии двух субпопуляций клеток с разной радиочувствительностью, предсказывает, что радиочувствительная часть должна составлять примерно 4 % всей популяции и эта фракция клеток в 60 раз более радиочувствительна, чем все остальные клетки [14]. Это мало вероятно, т. к. максимальное различие в радиочувствительности отдельных фаз клеточного цикла у клеток млекопитающих *in vitro* не превышает 10 [18]. Кроме того, на частично синхронизированной и асинхронной популяциях клеток китайского хомячка, облученных рентгеновскими лучами и нейтронами, показана одинаковая величина относительной биологической эффективности, что косвенно свидетельствует об идентичной форме кривой доза-эффект вне зависимости от распределения клеток по фазам клеточного цикла [13]. Тем не менее, как отмечается некоторыми авторами [17,19], приведенные аргументы не исключают а priori того, что ГЧ при малых дозах является следствием преимущественной гибели клеток в радиочувствительной фазе митотического цикла, например G₂/M.

Большинство исследователей, однако, дают другое объяснение сложной формы кривой доза-эффект: ГЧ отражает высокую радиочувствительность всех

клеток на фоне постоянно функционирующей конститутивной репарации, повышение же радиорезистентности клеточной популяции в целом происходит в результате включения индуцибельной репарации при определенном уровне повреждения клеток [13-21]. Это означает, что биологический ответ на облучение меняется с дозой и экстраполяция эффектов высоких доз на область низких доз неправомерна.

Задача настоящего исследования состояла в изучении дозовой зависимости индукции цитогенетических повреждений и анализе закономерностей, лежащих в ее основе, на клетках млекопитающих двух линий. Применяли анафазный и метафазный анализ аберраций хромосом, а также микроядерный тест. Эксперименты проводили на асинхронных и синхронизированных клеточных популяциях.

Материалы и методика

В работе использовали клетки китайского хомячка линии V-79 и меланомы человека линии BRO. При использовании анафазного метода и микроядерного теста исследования проводили на асинхронных популяциях клеток указанных линий, находящихся в логарифмической стадии роста. Методика культивирования и приготовления препаратов описана в [22,23]. Длительность митотического цикла клеток китайского хомячка в условиях нашего эксперимента составляла 12 ч, клеток меланомы человека - 20 - 24 ч.

Для облучения использовали γ -лучи ^{60}Co с мощностью дозы 18 сГр/мин. При исследовании дозовой зависимости индукции хромосомных аберраций анафазным методом клетки китайского хомячка и меланомы человека фиксировали соответственно через 8 и 11 ч, при использовании микроядерного теста - через 20 и 30 ч после однократного облучения. Определяли процент клеток с мостами и ацентрическими фрагментами или количество клеток с микроядрами на 1 тысячу клеток. На каждую дозу использовали по четыре параллельные пробы и анализировали несколько тысяч анафаз и не менее 10 тысяч интерфазных клеток на микроядерный тест.

Изучение зависимости доза-эффект с использованием метафазного анализа aberrаций хромосом осуществляли на синхронизированных клетках китайского хомячка. Синхронизированную популяцию получали методом митотического стряхивания, основанном на селективном отделении делящихся клеток от монослоя механическим путем. Клетки рассаживали в количестве $2 \cdot 10^7$ клеток в 750-см² круглые флаконы и культивировали в течение 24 ч. Делящиеся клетки отделяли путем вращения флаконов при 200 об./мин в течение 1 мин. Все встряхивания были разделены 25-мин интервалами. Делящиеся клетки центрифугировали, ресуспензировали в определенном объеме среды и рассаживали в количестве $(2-4) \times 10^5$ в культуральные флаконы. Через 2 ч после посева, когда, как показала проточная цитометрия, не менее 95 % клеток находились в G₁-фазе, клетки облучали рентгеновскими лучами в следующих условиях: 250 кэВ, 20 мА, фильтр 1 мм Cu, и 1 мм Al, мощность дозы 20 сГр/мин. Через 10 - 12 ч после облучения клетки в течение двух часов подвергали обработке колцемидом (0,1 мкг/мл). Препараты для метафазного анализа хромосом готовили и окрашивали по стандартной методике. При малых дозах облучения (1 - 50 сГр) просчитывали не менее 1 тыс. метафаз на дозу.

Все препараты анализировали в зашифрованном виде.

При обработке результатов использовали стандартные методы статистического анализа.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показана зависимость количества клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения в асинхронных популяциях клеток китайского хомячка и меланомы человека. Кривые доза-эффект имеют сходный ярко выраженный нелинейный характер. Процент aberrантных клеток возрастает в диапазоне 0 - 10 и 0 - 20 сГр у клеток меланомы человека и китайского хомячка соответственно (участок ГЧ), затем резко снижается. У клеток меланомы при

дозе 20 сГр процент клеток с абберациями ниже контрольного уровня, т. е. имеет место обратная зависимость от дозы. С ростом дозы выше 30 - 50 сГр дозовая зависимость становится линейной (ИР), однако наклон кривой значительно уменьшается по сравнению с наклоном участка ГЧ.

Представленные кривые отражают реакцию на облучение фракции клеток, делящихся через 8 и 11 ч (клетки китайского хомячка и меланомы человека соответственно). Количество клеток с микроядрами на этих же препаратах отражает дозовую зависимость цитогенетических повреждений всех клеток, поделившихся после облучения к этому времени (рис. 2а), а подсчет микроядер через 20 и 30 ч дает возможность оценить реакцию на облучении всей популяции за клеточный цикл (рис. 2б). По этому критерию выявляются те же закономерности, что и по индукции хромосомных аббераций: ГЧ ярко выражена на ранних сроках после облучения, особенно у клеток меланомы, затем имеет место обратная зависимость от дозы (клетки меланомы) или дозозависимый участок (клетки китайского хомячка), после чего зависимость становится линейной с наклоном на порядок ниже, чем наклон кривой на участке ГЧ.

Аналогичные дозовые зависимости получены по индукции хромосомных перестроек в синхронизированной популяции клеток китайского хомячка при использовании метафазного метода (рис.3а,б). Анализ проводился в первом митозе после облучения. Особенно ярко выраженный нелинейный характер кривой доза-эффект выявляется по числу аббераций на 100 клеток.

Форма кривой практически совпадает с таковой, полученной с применением анафазного метода и микроядерного теста.

Тот факт, что феномен ГЧ воспроизводится как на асинхронной, так и на синхронизированной популяциях клеток, свидетельствует о том, что он обусловлен высокой радиочувствительностью всей клеточной популяции в узком диапазоне малых доз и не связан с гибелью фракции клеток, находящихся в радиочувствительной фазе клеточного цикла. С ростом дозы все клетки становятся более радиорезистентными вследствие, как можно полагать, индукции процессов репарации. Таким образом, другое, более вероятное,

объяснение нелинейности кривой доза-эффект и большей эффективности облучения на единицу дозы малыми дозами, чем большими, состоит в том, что при определенном уровне повреждения клеток включаются индуцибельные репарационные системы, следствием чего является изменение радиочувствительности клеток и наклона кривой доза-эффект.

Весьма вероятно, что феномен ГЧ/ИР при однократном облучении аналогичен по своей природе адаптивному ответу (АО), наблюдаемому при двухкратном облучении и который также связывают с индукцией систем репарации [24-28]. Если эта гипотеза верна, то на фоне индуцированных предоблучением репарационных процессов должен меняться характер кривой доза-эффект - участок ГЧ не будет выявляться. Для проверки этого предположения клетки китайского хомячка и меланомы человека облучали дозами, оптимальными для индукции АО - 20 и 1 сГр соответственно [29], а через 5 ч в дозах от 1 до 200 сГр. На рис. 4 показана зависимость числа индуцированных облучением дозами 1 - 200 сГр клеток с хромосомными aberrациями при указанных условиях воздействия. В качестве нулевого уровня принимали количество aberrантных клеток в контроле (однократное облучение, кривая 1) и индуцированное предоблучением (двухкратное облучение, кривая 2). Видно, что в этой серии экспериментов при однократном облучении на обеих линиях клеток участок ГЧ наблюдается в диапазоне 0 - 1 сГр. На клетках китайского хомячка ИР проявляется после дозы 50 сГр. На клетках меланомы человека в диапазоне 1 - 30 сГр практически отсутствует зависимость эффекта от дозы, ИР наблюдается начиная с дозы 30 - 50 сГр. Дозовая зависимость индукции клеток с aberrациями на фоне предоблучения характеризуется не только отсутствием участка ГЧ, но и снижением процента aberrантных клеток ниже нулевого уровня, т. е. восстановлением некоторой части предсуществующих (спонтанных или индуцированных первым облучением) хромосомных перестроек. Наиболее значительно это снижение числа aberrантных клеток выражено на клетках меланомы человека. ИР проявляется на клетках китайского хомячка начиная с дозы 70 сГр, на клетках меланомы - с

10 сГр. Это свидетельствует о том, что процессы ИР в клетках меланомы человека "работают" более эффективно, чем в клетках китайского хомячка, что согласуется с результатами, полученными ранее при изучении АО на этих клеточных линиях [29].

Таким образом, полученные данные позволяют проанализировать взаимосвязь между ГЧ/ИР при однократном облучении и АО. На синхронизированных клетках китайского хомячка установлено, что ГЧ при малых дозах на кривой доза-эффект обусловлена не высокой радиочувствительностью небольшой фракции клеток в определенной фазе клеточного цикла, а связана с радиочувствительностью всей клеточной популяции. При достижении определенного уровня повреждения малыми дозами повышается радиорезистентность всех клеток. Логично предположить, что в основе повышения радиорезистентности после однократного облучения малыми дозами лежат те же механизмы, что и при АО. АО, как установлено, является следствием индукции малыми дозами репарационных процессов, делающих клетки менее чувствительными к последующему облучению [24-28, 30]. Тот факт, что на предоблученных малыми дозами клетках ГЧ на кривой доза-эффект не выявляется, дает основание утверждать, что индукция репарационных механизмов первой дозой защищает изначально радиочувствительные клетки, переводя их в радиорезистентное состояние. Это свидетельствует о том, что в основе феномена ГЧ/ИР и АО лежат аналогичные по своим механизмам и проявлению процессы индуцибельной репарации. Изучение сигнальных и молекулярных механизмов [30-32], лежащих в основе индуцибельных процессов может открыть новые возможности для защиты от облучения, повышения эффективности лучевой терапии рака и оценки генетического риска облучения.

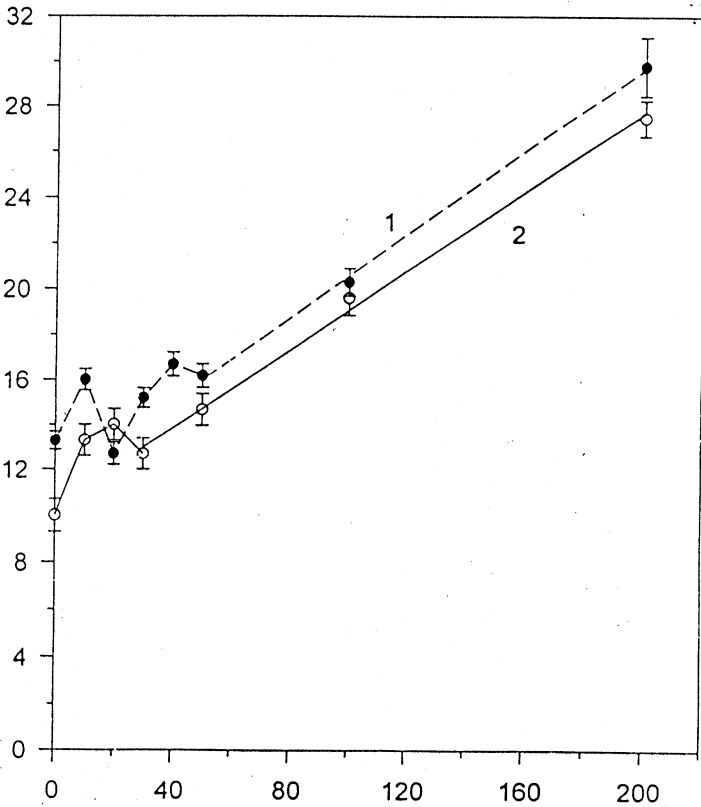


Рис. 1. Зависимость выхода клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения.

1 - клетки меланомы человека; 2 - клетки китайского хомячка.

По оси абсцисс - доза облучения, сГр; по оси ординат - количество клеток с aberrациями, %.

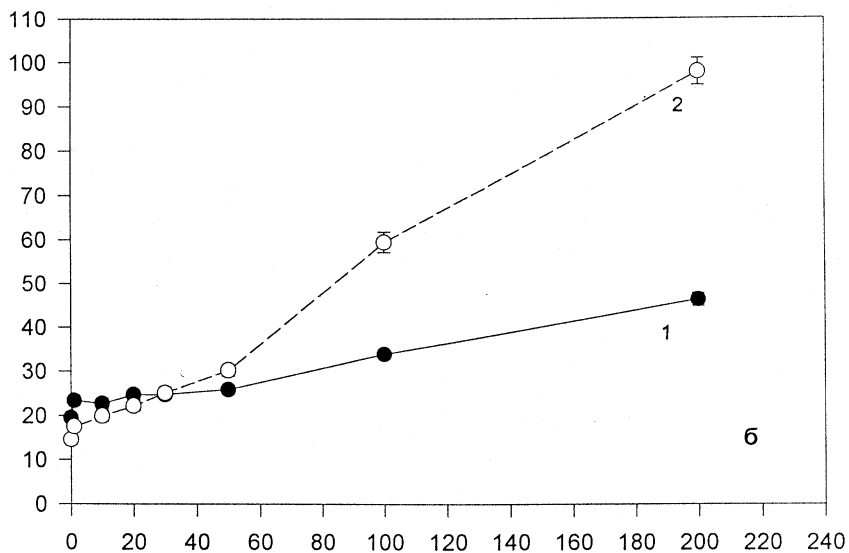
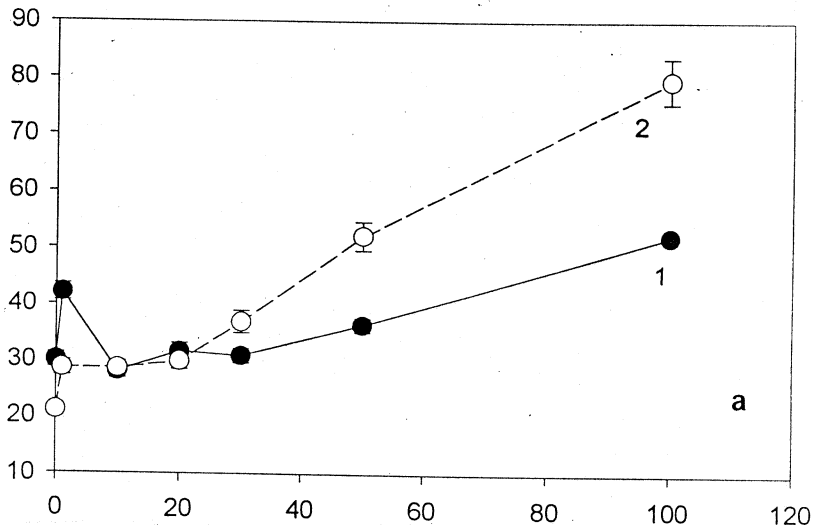


Рис. 2. Дозовая зависимость выхода клеток с микродрами после облучения клеток меланомы человека (а) и китайского хомячка (б).
 а: 1 - 11ч после облучения; 2 - 30ч после облучения.
 б: 1 - 8ч после облучения; 2 - 20ч после облучения.

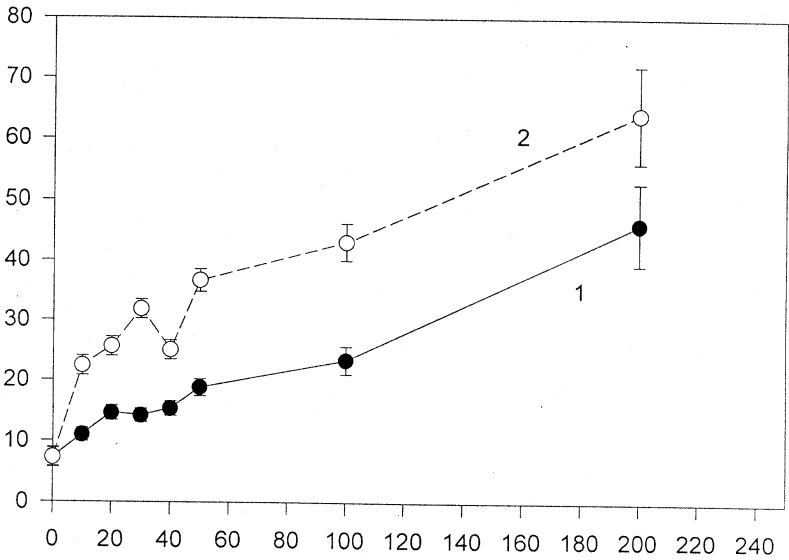


Рис. 3. Процент клеток с хромосомными aberrациями (1) и число aberrаций на 100 клеток (2) после облучения синхронизированных клеток китайского хомячка. По оси абсцисс - доза облучения, сГр; по оси ординат - % клеток с aberrациями и число aberrаций на 100 клеток.

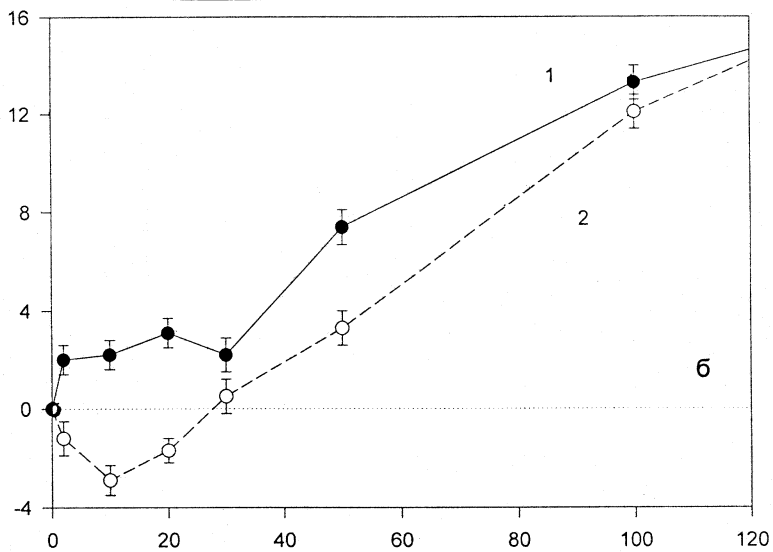
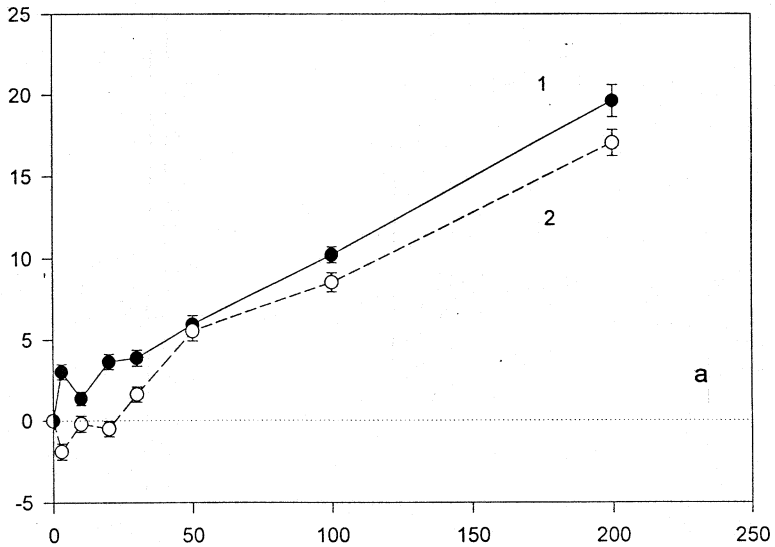


Рис. 4. Дозовая зависимость индукции клеток с хромосомными aberrациями в клетках китайского хомячка (а) и меланомы человека (б), облученных однократно (1) и предоблученных адаптирующими дозами (2).

По оси абсцисс - доза облучения, сГр; по оси ординат - % клеток с aberrациями, индуцированными дозами 1-200 сГр.

Список литературы

1. Гофман Д. // Чернобыльская авария: радиационные последствия для настоящего и будущего поколений. Высшая школа, Минск, 1999.
2. Luckey T.D.// Radiation hormesis. CRS Press, Boca Raton, Florida, USA, 1991.
3. International Commission on Radiation Protection. 1990 Recommendation of the ICRP, Pub.60. Annals of the ICRP, V. 21. N1-3. Pergamon Press. Oxford. 1991.
4. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99). Минздрав России. 1999.
5. Pohl-Rulling J., Fisher P., Haas O. et al.// Mutat. Res. 1983. V. 110. P. 71-82.
6. Lloyd D. C., Edwards A., Leonard A. et al.// Int. J. Radiat. Biol. 1992. V. 61. P. 335-343.
7. Севаньяев А. В, Лучник Н. В.// Генетика. 1977. Т. 13. Вып. 3. С. 524-532.
8. Гераськин С. А.//Радиациобиология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. Вып. 5. С. 563-571.
9. Заичкина С. И. Аптикаева Г. Ф., Ахмадиева А. Х. и др.// Радиобиология. 1992. Т. 32. Вып. 1. С. 38-41
10. Mitchell J. C., Norman A.//Int. J. Radiat. Biol. 1987. V. 52. P. 527-535.
11. Oftedal P.//Proceeding of the workshop on genetic effects of charged partikles. 1990. Dubna. P.11-13.
12. Palcic B., Jaggi B.//Int. J. Radiat. Biol. 1986. V. 50. P. 345-352.
13. Marples B., Joiner M. C.//Radiat. Res. 1993. V. 133. P. 41-51.
14. Lambin P., Fertil B., Malaise E. P., Joiner M. C.//Radiat. Res. 1994. V. 38. S.32-S.36.
15. Puck T. T., Marcus P. J.//J. Exp. Med. V. 103. P. 653-666.
16. Wounter B. J., Skarsgard L. D.//Radiat Res. 1997. V. 148. P. 435-442.
17. Short S., Mayes C., Boulton P. et al.//Int. J. Radiat. Biol. 1999. V. 75. P. 1341-1348.
18. Sinclair W. K.//Curr. Top. Radiat. Res. 1972. V. 7. P. 264-285.
19. Lambin P., Marples B., Fertil B.//Int. J. Radiat. Biol. 1993. V. 63. P. 639-650.
20. Skov K.A.//Mutat. Res. V.430. P. 241-253.

21. Joiner M.C., Marples B., Llambin P. et al.//Int.J.radiat. Oncol., Biol., Phys. 2001. V. 49. P. 379-389.
22. Shmakova N.L., Fadeeva T.A., Krasavin E.A. et al.//Nukleonika 1999. V. 44. P. 539-548.
23. Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А.//Радиационная биология. Радиоэкология. 1998. Т. 38. Вып. 6. С. 841-847.
24. Olivieri G., Bodicote J., Wolff S.//Science. 1984. V. 223. P. 549-597.
25. Wienske J.K., Afzal V., Olivieri S., Wolff S.//Mutagenesis. 1986. V. 1. P.375-380.
26. Wolff S., Afzal V., Wienke J. et al.//Int. J. Radiat. Biol. 1988. V. 53. P. 39-48.
27. Shadley J.D., Walff S.//Mutagenesis. 1987. V. 2. P. 95-96.
28. Shadley J.D., Wiencke J.//Int. J. Radiat. Biol. 1988. V. 56. P. 107-118.
29. Шмакова Н.Л. Абу Зеид О., Фадеева Т.А. и др.//Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. Вып. 4. С. 405-409.
30. Stecca C.,Gerber G.B.//Biochem.Pharmacol. 1998. V. 55. P. 941-951.
31. Hendrikse A.S., Hanter A.J., Keraan M., Blekkenhorst G.H.//Int. J.Radiat. Biol. 2000. V. 76. P. 11-21.
32. Sadecova S., Lehnert S., Chow T. J.K.//Int. J. Radiat. Biol. 1997. V. 72. P. 653-660.
33. Joiner M.C., Marples B., Lambin P. et al.// Int. J. Radiat. oncol.biol. phys. 2001. V. 49. P. 379-389.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 сентября 2001 года.

Шмакова Н.Л. и др.

P19-2001-184

Цитогенетические эффекты малых доз облучения
в клетках млекопитающих: анализ феномена гиперчувствительности
и индуцированной резистентности

На клетках китайского хомячка и меланомы человека с использованием анафазного и метафазного методов анализа аберраций хромосом и микроядерного теста изучена зависимость доза–эффект в диапазоне 1–200 сГр. По всем цитогенетическим критериям показана гиперчувствительность (ГЧ) клеток обеих линий при дозах ниже 20 сГр и повышение радиорезистентности (ИР) при более высоких дозах. Феномен ГЧ/ИР воспроизводится как на асинхронной, так и на синхронизированной популяциях клеток китайского хомячка. Это свидетельствует о том, что ГЧ обусловлена высокой радиочувствительностью всей популяции и не связана с гибелью фракции клеток в радиочувствительной фазе клеточного цикла, а повышение радиорезистентности, по-видимому, является следствием индукции процессов репарации также во всех клетках. Данный вывод подтверждается тем, что на фоне индуцированных предоблучением малыми дозами (1 и 20 сГр) процессов репарации ГЧ на кривой доза–эффект не выявляется и имеет место восстановление некоторой части предсуществующих (спонтанных или индуцированных предоблучением) хромосомных нарушений. Предполагается, что в основе феномена ГЧ/ИР и адаптивного ответа лежат аналогичные по своей природе процессы индуцибельной репарации.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2001

Shmakova N.L. et al.

P19-2001-184

Cytogenetic Effects of Low Dose Radiation in Mammalian Cells:
Analysis of the Phenomenon Hypersensitivity and Induced Radioresistance

The induction of cytogenetic damage after irradiation of chinese hamster cells and human melanoma cells within dose range 1–200 cGy was studied. The anaphase and metaphase analysis of chromosome damage and micronuclei test were applied. The hypersensitivity (HRS) at doses below 20 cGy and the increased radioresistance at higher doses (IR) were shown with all cytogenetic criteria for both cell lines. The phenomenon of HRS/IR was reproduced in synchronic as well as in asynchronous population of chinese hamster cells. This fact shows that HRS was caused by high radiosensitivity of all cells and can not be explained by any differential sensitivity of cells in different phases of the cell cycle. So it was supposed that the increasing radioresistance is determined by the inclusion of the inducible repair processes in all cells. This conclusion agrees with the fact that there was no evidence of HRS on dose–effect curves and that some part of pre-existent damage was repaired after preliminary irradiation with low doses (1–20 cGy) which induce repair processes. It can be concluded that same inducible repair processes are analogous in mechanisms underlying in the base of HRS/IR phenomenon and adaptive response.

The investigation has been performed at the Division of Radiation and Radiobiological Research, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2001

Редактор М.И.Зарубина. Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 01.11.2001
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. л. 0,86
Тираж 230. Заказ 52931. Цена 86 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области