

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

98-22

P19-98-22

Н.Л.Шмакова, Т.А.Фадеева, Е.А.Красавин

ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ
НА КЛЕТКИ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

1998

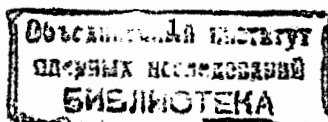
Установление формы кривой доза-эффект в области малых доз ионизирующей радиации является необходимым условием для прогнозирования генетического и канцерогенного риска как для отдельных индивидуумов, так и в случаях массового облучения населения малыми дозами радиации.

Трудности оценки эффектов непосредственно малых доз связаны со сложностью получения статистически достоверных данных при низких уровнях повреждения, вызванных этими дозами.

В связи с этим оценка риска при действии малых доз осуществляется на основе экстраполяции результатов с области высоких доз на низкие. Использование для такого рода экстраполяции различных моделей ведет к ряду противоречий. Линейная экстраполяция предполагает прямую зависимость эффекта от физической дозы во всем диапазоне доз. Исходя из пороговой гипотезы, можно ожидать более слабого воздействия малых доз вследствие включения биологических процессов, способных модифицировать первичный ответ на физическое воздействие. Надлинейная экстраполяция основана на предположении о большей эффективности малых доз по сравнению с высокими, поскольку индуцибельные радиозащитные процессы инициируются при определенных уровнях повреждения.

В настоящее время наиболее распространенной и официально признанной является беспороговая линейная концепция как наиболее "осторожная" для оценки риска и защиты населения, поскольку она предполагает опасность любого даже самого малого превышения естественного радиационного фона.

В настоящее время накапливается все больше экспериментальных данных о неправомерности линейной экстраполяции эффектов высоких доз на низкие. Наиболее приемлемым критерием для оценки эффектов малых доз является частота генетических повреждений в клетках разного типа, характеризующаяся четкой количественной зависимостью в широком диапазоне доз. Самыми распространенными тест-системами для этих целей являются лимфоциты периферической крови человека и клетки



растений. Как на растениях [1-3], так и в наиболее систематичных и многочисленных исследованиях на лимфоцитах [4-6] убедительно показан сложный нелинейный характер выхода хромосомных aberrаций в области малых доз облучения. Характерной особенностью дозовых кривых, хорошо воспроизводимой на различных объектах разными авторами, является наличие дозозависимого участка, расположенного в диапазоне 10-50 сГр. Аналогичные закономерности были получены по индукции микроядер в клетках китайского хомячка, однако в этом случае плато сдвинуто в область более высоких доз (50-100 сГр) [7]. Такого же рода дозовые зависимости получены по критерию злокачественной трансформации в культуре фибробластов мыши [8].

Обнаруженные закономерности выхода цитогенетических повреждений в области малых доз носят универсальный характер, причем как правило отмечается более высокая эффективность воздействия на единицу дозы в диапазоне малых доз, чем при облучении в высоких дозах. Большинство авторов связывают это с включением репарационных систем при определенных уровнях повреждения [9,10].

До последнего времени в литературе отсутствовали данные по выживаемости клеток млекопитающих при малых дозах. Применяемая обычно методика определения клоногенной способности клеток, разработанная Паком и Маркусом [11], недостаточно точна для определения выживаемости при дозах ниже 2 Гр. Для описания формы кривой выживаемости клеток *in vitro* широко использовалась линейно-квадратичная модель, подразумевающая, что с уменьшением дозы уменьшается наклон кривой, т.е. кривая выживаемости характеризуется наличием плеча. Однако появились данные, показывающие, что линейно-квадратичная модель "недооценивает" эффект облучения дозами ниже 1Гр.

Для преодоления слабой разрешающей способности метода Пака и Маркуса при облучении в малых дозах были использованы методы прецизионного определения числа клеток, исследуемых на клоногенную способность. Marples и Joiner [12], используя метод динамического

компьютерного микроскопического сканирования, позволяющего точно фиксировать положение отдельных прикрепившихся клеток и прослеживать формирование колоний из каждой из них, на асинхронной популяции клеток китайского хомячка V-79-379A, облученных рентгеновскими лучами, показали, что дозовая кривая в диапазоне 1-10 Гр хорошо описывается линейно-квадратичной моделью, однако при дозах ниже 0,6 Гр эффективность облучения была значительно выше ожидаемой (рис.1). Позднее аналогичные результаты были получены на нескольких линиях клеток, причем была установлена корреляция между выраженностью этого феномена и радиочувствительностью клеток – чем радиорезистентней клетки, тем сильнее у них выражена радиочувствительность при малых дозах [13]. Одновременно было установлено, что повышение радиорезистентности не связано с изменением продвижения клеток по клеточному циклу при увеличении дозы облучения [12]. Обнаруженная дозовая зависимость, по мнению авторов [12-14], обусловлена индуцибельной репарацией или стрессовым ответом облученных клеток: малые дозы более эффективны на единицу дозы, чем высокие, т.к. необходим достаточный уровень повреждения для запуска репарационных систем или других радиозащитных механизмов. Исходя из этой гипотезы эта аномальная дозовая зависимость была обозначена как гиперчувствительность (ГЧ) при малых дозах и индуцированная радиорезистентность (ИР) при больших дозах.

Таким образом, как в цитологических исследованиях, так и при изучении клоногенной способности клеток прецизионными методами показан сложный нелинейный характер дозовой зависимости при низких уровнях облучения, однако ни те, ни другие исследования не дают основания для выбора единой концепции биологического действия малых доз, хотя большинство авторов отдает предпочтение репарационной гипотезе.

В настоящем исследовании мы ставили перед собой задачу изучения феномена ГЧ/ИР, обнаруженного по выживаемости клеток, с помощью цитогенетических методов. Поскольку для получения

статистически достоверной информации по оценке цитогенетических эффектов малых доз необходимо исследовать большое количество делящихся клеток и учитывая трудоемкость метафазного метода анализа aberrаций хромосом, мы применяли анафазный метод, позволяющий анализировать несколько тысяч митозов на дозу.

Материалы и методика

Исследования проводили на клетках китайского хомячка линии V-79, культивируемых в стандартных условиях на среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и антибиотиков.

Для приготовления цитологических препаратов клетки рассеивали в бюксы с покровными стеклами размером 18x18 по $(3-5) \times 10^5$ клеток на бюкс за сутки до облучения. Радиационное воздействие осуществляли с помощью γ -лучей ^{60}Co при мощности дозы 18 сГр/мин. Через 3, 10 и 20 ч после облучения стекла фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1) и окрашивали ацетоорсеином. Определяли процент клеток с мостами и ацентрическими фрагментами (3 и 10 ч после облучения) и с микроядрами (20 ч после облучения).

Все препараты считали в зашифрованном виде. На каждую дозу использовали по четыре параллельных пробы и просчитывали 3-5 тыс. анафаз или 15-20 тыс. интерфазных клеток для микроядерного теста.

Опыты ставили в двух-трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Рис.2а и 2б отражают зависимость количества клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения соответственно через 10 и 3 часа после радиационного воздействия. Таким образом, в первом случае анализируются клетки, облученные преимущественно в S-фазе митотического цикла, во втором - в G_2 -фазе.

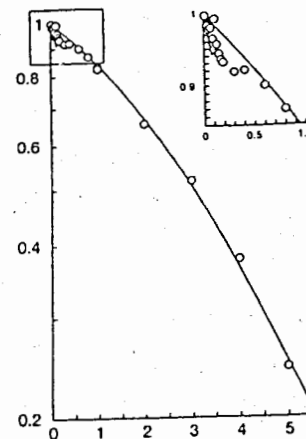


Рис.1. Выживаемость клеток китайского хомячка линии V-79-379A после рентгеновского облучения 250 кВ, измеренная методом компьютерного микроскопического сканирования. Данные из работы [12]. По оси абсцисс - доза облучения. Гр. по оси ординат - доля выживших клеток

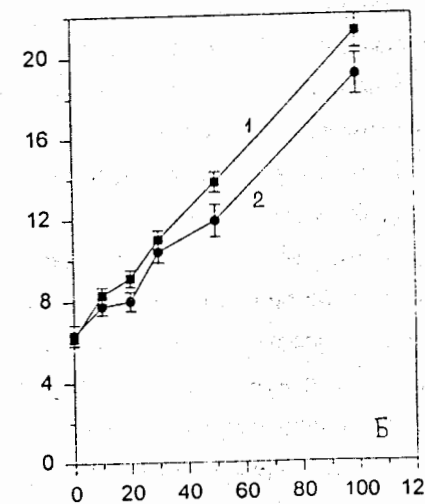
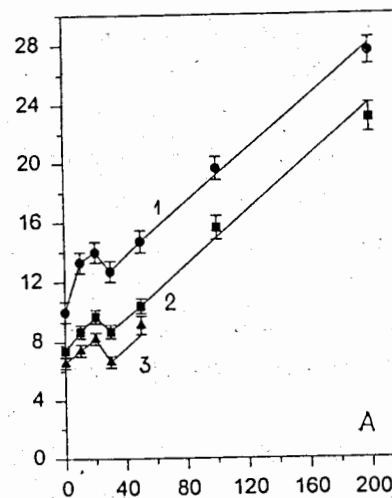


Рис. 2. Зависимость выхода клеток китайского хомячка с хромосомными aberrациями от дозы облучения. А - время фиксации 10ч после облучения (три эксперимента); Б - время фиксации 3ч после облучения (два эксперимента). По оси абсцисс - доза облучения, сГр. по оси ординат - доля клеток с aberrациями (%)

На рис.2а (время фиксации 10 ч после облучения) показаны результаты трех независимых экспериментов. Процент клеток с хромосомными aberrациями во всех случаях увеличивается в диапазоне 0-20 сГр, после чего достоверно снижается иногда почти до контрольного уровня. При дозах выше 30 сГр радиорезистентность клеток возрастает, и наблюдается линейное увеличение числа клеток с aberrациями, однако с меньшим наклоном, чем в интервале 0-20 сГр. Фаза ГЧ при 0-20 сГр в разных экспериментах выражена в разной степени, начальный наклон кривых значительно различается, что, возможно, связано с достаточно большим интервалом исследованных доз. Наклон кривых, отражающий ИР клеток, в обоих опытах одинаков и отличается от первоначального наклона в 1,3-2 раза (таблица).

На рис.2б (время фиксации 3ч после облучения) представлены результаты двух опытов, в которых феномен ГЧ/ИР практически не выражен. Радиочувствительность в интервале 0-20 сГр (ГЧ) проявляется примерно в той же степени, что и у клеток, облученных в S-фазе, однако после некоторого нарушения линейности кривой доза-эффект ее наклон практически не меняется, т.е. фаза ИР отсутствует (таблица). При дозах выше 20 сГр клетки, облученные в G₂, являются значительно более радиочувствительными, чем клетки, подвергнутые радиационному воздействию в S-фазе. Это дает основание полагать, что различие в радиочувствительности фаз клеточного цикла обусловлено способностью клеток переходить от фазы ГЧ к ИР, для запуска же процессов индуцибельной репарации требуется достаточно большое время, по крайней мере больше трех часов.

Для оценки цитогенетических повреждений клеток за весь митотический цикл при действии γ -излучения в разных дозах был использован микроядерный тест, являющийся непрямым индикатором повреждения хромосом. На рис.3 показаны результаты двух таких опытов. Процент клеток с микроядрами линейно возрастает во всем диапазоне исследованных доз. Не было обнаружено дозозависимого участка,

Таблица. Индукция клеток с хромосомными aberrациями на единицу дозы после облучения γ -лучами ⁶⁰Co (клетки китайского хомячка, V-79)

Время фиксации после облучения (час)	№ кривой	Интервал доз (сГр)	Число клеток с aberrациями/сГр	Соотношение наклонов кривых
10	1	0-20 30-200	0,2 0,09	2,2
	2	0-20 30-200	0,115 0,09	1,3
	3	0-20 30-50	0,1 0,1	1
3	1	0-20 20-100	0,145 0,15	1
	2	0-10 20-100	0,14 0,143	1

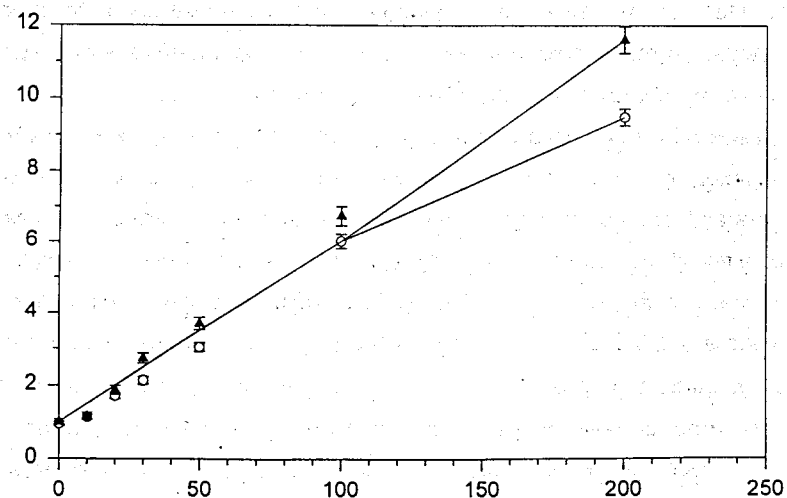


Рис. 3. Зависимость выхода клеток китайского хомячка с микроядрами от дозы облучения (два эксперимента). По оси абсцисс - доза облучения, сГр; по оси ординат - клетки с микроядрами (%).

показанного по этому критерию на фибробластах китайского хомячка другой линии [7].

Поскольку большая часть клеток в асинхронной популяции использованной нами линии находится в S-фазе, можно было ожидать, что феномен ГЧ/ИР должен быть зафиксирован и по микроядерному тесту.

Это кажущееся противоречие, вероятно, можно объяснить несколькими причинами: микроядра формируются из ацентрических фрагментов и отставших хромосом, клетки же, имеющие мосты, не учитываются с помощью этого теста; некоторая часть клеток с хромосомными абберациями, обнаруживаемыми в анафазе, вероятно погибает в процессе первого митоза, а за 20 ч какая-то часть клеток могла поделиться дважды. Все вышесказанное хорошо согласуется с тем фактом, что в контроле количество клеток с абберациями превышает количество клеток с микроядрами в 6-8 раз. Следовательно, микроядерный тест учитывает не все цитогенетические повреждения и является значительно менее точным и информативным, чем подсчет клеток с хромосомными абберациями. К такому же выводу пришел автор работы [15], который также на клетках китайского хомячка линии V-79 по микроядерному тесту показал значительно меньший адаптивный ответ, чем по частоте сестринских хроматидных обменов.

Таким образом, показанный по клоногенной способности клеток V-79 переход от ГЧ к ИР с увеличением дозы, сопровождающийся снижением эффективности облучения на единицу дозы примерно в 2 раза, хорошо воспроизводится по цитологическим критериям. Индукция хромосомных повреждений в фазах ГЧ и ИР на единицу дозы также различается в 1,3-2 раза. Однако если по выживаемости клеток V-79 в диапазоне 20-50 сГр имеет место плато – дозозависимый участок, то по индукции хромосомных повреждений в этом интервале доз удается выявить обратную зависимость от дозы – при дозе 30 сГр количество клеток с хромосомными абберациями меньше, чем при дозе 20 сГр, а в некоторых случаях падает до контрольного уровня.

При анализе этого явления в принципе можно сделать два различных предположения относительно причины ГЧ/ИР. ГЧ может быть результатом возникновения большего числа повреждений на единицу дозы при малых дозах, чем при больших, и более правдоподобное и логичное: ГЧ – следствие отсутствия или неполноценности репарации радиационных повреждений при малых дозах. В пользу последнего предположения свидетельствует резкое снижение количества генетических повреждений после дозы 20 сГр и последующее повышение радиорезистентности.

Таким образом, на основании собственных результатов и сопоставления их с имеющимися литературными данными мы полагаем, что изменение радиорезистентности клеток после определенного уровня повреждения связано с индуцибельной репарацией и по своему проявлению аналогично адаптивному ответу, показанному ранее на лимфоцитах периферической крови [16] и позже на других типах клеток [15,16]. В настоящее время накапливается все больше экспериментальных данных, свидетельствующих об общности механизмов, лежащих в основе феномена ГЧ/ИР и адаптивного ответа, и об их связи с процессами репарации. Для развития ИР так же, как и для проявления адаптивного ответа, требуется 6-8 часов [17]. Циклогексимид [14,18] и 3-аминобензамид [19,20] блокируют развитие ИР и адаптивного ответа, что указывает на связь этих явлений с процессами репарации. Кроме того, линии клеток, дефицитные по репарации двунитевых разрывов ДНК и по эксцизионной репарации имеют экспоненциальную кривую выживаемости; в то же время для клеток, дефицитных по репарации одонитевых разрывов, характерен переход от ГЧ к ИР [21].

Все это дает основание полагать, что ИР после облучения малыми дозами связана с восстановлением двунитевых разрывов ДНК и эксцизионной репарацией. Тот факт, что феномен ГЧ/ИР хорошо воспроизводится по критерию индукции клеток с хромосомными абберациями, также свидетельствует в пользу этого положения.

Список литературы

1. Лучник Н.В. // Биофизика. 1957. Т.2. Вып.1. С.86-93.
2. Luchnik N.V. // Radiat. Environ. Biophys. 1975. V.12. № 3. P.197-204.
3. Гераськин С.А. // Радиация. биология. Радиозэкология. 1995. Т.35. Вып.5. С.563-571.
4. Pohl-Ruling J., Fischer P., Haas O. et al. // Mutat. Res. 1983. V.110. №1. P.71-82.
5. Lloyd D.C., Edvards A.A., Leonard A. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 1988. V.53. №1. P.49-55.
6. Lloyd D.C., Edvards A.A., Leonard A. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 1992. V.61. P.335-343.
7. Заичкина С.И., Аптикаева Г.Ф., Ахмадиева А.Х. и др. // Радиобиология 1992. Т.32. Вып.1. С.38-41.
8. Lefrankois D., Al Achkar W., Aurias A. et al. // Mutat. Res. 1989. V.212. P.167-172.
9. Гераськин С.А. // Радиация. биология. Радиозэкология. 1995. Т.35. Вып.5. С.571-580.
10. Wolff S. In: Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms. (Sugahara T., Sagan L.A., Aoyama T. eds) Amsterdam-London-New York-Tokyo. Excerpta Medica. 1992. P.21-28.
11. Puck T.T., Marcus P.I. // J. Exp. Med. 1956. V.103. P.653-666.
12. Marples B., Joiner M.C. // Radiat. Res. 1993. V.133. P.41-51.
13. Lambin P., Fertil B., Malaise E.P., Joiner M.C. // Radiat. Res. 1994. V.138. S32-S36.
14. Joiner M.C., Lambin P., Malaise E.P. et al. // Mutation Res. 1996. V.358. P.171-183.
15. Ikushima T. // Mutation Res. 1987. V.180. P.215-221.
16. Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. // Science. 1984. V.223. P.594-597.
17. Kurihara Y., Rienkarn M., Eton H. // J. Radiat. Res. 1992. V.33. P.267-274.
18. Marples B., Joiner M.C. // Radiat. Res. 1995. V.141. P.160-169.

19. Wolff S. // Radiat. Res. 1992. V. 131. P.117-123.
20. Marples B., Joiner M.C. // Radiat. Res. 1995. V.141. P.160-169.
21. Skow K.B., Marples B., Matthews J.B. et al. // Radiat. Res. 1994. V.138. S126-S128.

Рукопись поступила в издательский отдел
12 февраля 1998 года.