



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

99-319

P19-99-319

Н.Л.Шмакова, О.Абу Зеид, Т.А.Фадеева,
Е.А.Красавин, П.В.Куцало

ДОЗОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ И АДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

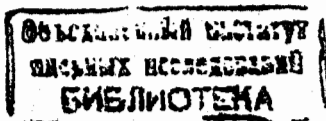
1999

Проблема биологического действия малых доз ионизирующих излучений имеет много аспектов, и одним из важнейших является вопрос, связанный с экстраполяцией эффектов, вызываемых высокими дозами, на облучение в области низких доз. С этим вопросом связана проблема АО, т.е. повышение радиорезистентности клеток после облучения в малых дозах к последующему облучению в большой дозе.

В настоящее время накапливается все больше экспериментальных данных, свидетельствующих о неправомерности линейной экстраполяции эффектов высоких доз на низкие. Кривые индукции цитогенетических повреждений, полученные на лимфоцитах человека [1 - 3], растительных клетках [4 - 6], клетках млекопитающих в культуре [7, 8], характеризуются более высокой эффективностью на единицу дозы в диапазоне малых доз, чем при облучении высокими дозами, а также наличием дозозависимого участка между ними.

Применение метода компьютерного микроскопического сканирования для определения клоногенной способности клеток сделало возможным прецизионное определение выживаемости клеток млекопитающих при дозах ниже 1 Гр [9], что было невозможно при использовании обычного метода [10].

В настоящее время в четырех различных лабораториях мира получены точные данные по выживаемости при низких дозах облучения на десяти различных линиях клеток [11]. Установлено, что при дозах ниже 30 сГр клеткам свойственна очень высокая радиочувствительность, гиперчувствительность (ГЧ), которая не может быть предсказана обратной экстраполяцией с кривой выживаемости в диапазоне 1 - 10 Гр; в интервале 30 - 100 сГр выживаемость мало зависит от дозы. Такая сложная дозовая зависимость выживаемости объясняется авторами [11] так же, как при анализе индукции цитогенетических повреждений, индуцибельными процессами репарации, для запуска которых требуется определенный



уровень повреждения клеток. Чувствительность клеток к облучению при дозах выше 1 Гр соответственно названа индуцированной радиорезистентностью (ИР).

Другим аспектом действия малых доз облучения, в основе которого также, по-видимому, лежат стрессовые ответы клеток, запуск индуцибельных процессов репарации или других радиозащитных механизмов, является адаптивный ответ (АО). Лимфоциты человека, предварительно облученные в малых дозах излучением инкорпорированного тритиевого тимидина [12 - 14] или рентгеновскими лучами [15, 16], становятся менее чувствительными к последующему воздействию высокой дозы. Подобный эффект был показан на клетках китайского хомячка при тех же видах воздействия [17 - 19] и на растительных клетках [20].

Механизмы инициации АО изучены пока недостаточно [21]. АО сложным образом зависит от мощности дозы предварительного облучения [16], а также индуцируется другими ДНК-повреждающими агентами, такими как алкилирующие соединения и перекись водорода [22, 23]. Все это создает сложности в сопоставлении результатов и объясняет противоречия в данных разных авторов.

В качестве критерия для оценки величины АО, так же, как при анализе зависимости доза - эффект, обычно используются генетические повреждения - хромосомные aberrации, микроядра, мутации.

Практически во всех экспериментальных работах указанные два аспекта действия малых доз рассматриваются отдельно друг от друга.

Задачей настоящего исследования является сопоставление на клетках млекопитающих двух линий дозовой зависимости индукции хромосомных aberrаций и способности к формированию АО с целью идентификации общих закономерностей и механизмов, лежащих в их основе.

В работе применяли анафазный метод анализа aberrаций хромосом, позволяющий анализировать несколько тысяч анафаз на дозу и обеспечивающий возможность получения статистически достоверной информации по оценке эффектов малых доз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на асинхронной популяции клеток китайского хомячка линии V-79 и меланомы человека линии BRO, находящихся в логарифмической фазе роста. Методика культивирования и приготовления цитологических препаратов описана в [24]. Длительность митотического цикла клеток китайского хомячка в условиях нашего эксперимента составляла 12 ч, клеток меланомы - около 20 ч.

Для облучения использовали γ -лучи ^{60}Co с мощностью дозы 18 сГр/мин. При получении кривой доза - эффект клетки китайского хомячка и меланомы фиксировали соответственно через 8 и 10 ч после однократного облучения. При изучении АО интервал между адаптирующей и тестируемой дозами составлял 5 ч; фиксацию проводили через 2 и 5 ч (клетки V-79) и 8 ч (BRO) после облучения в тестируемой дозе. Определяли процент клеток с мостами и ацентрическими фрагментами. На каждую дозу использовали по четыре параллельные пробы. Опыты ставили в двух-трех повторностях. Все препараты анализировали в зашифрованном виде.

Для количественной оценки эффективности проявления адаптивного ответа использовали способ, аналогичный методу, предложенному в [25]. Коэффициент адаптивного ответа рассчитывали по формуле

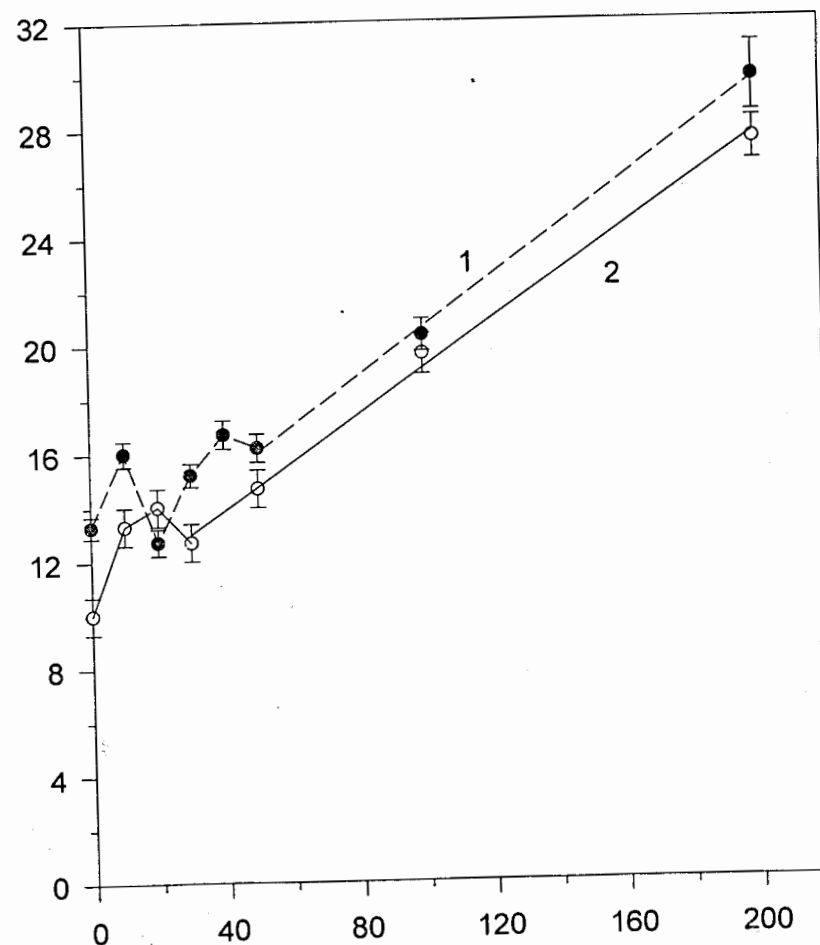
$$\text{КАО} = (\text{ХПа} + \text{т} - \text{Хпк}) / ((\text{ХПа} - \text{Хпк}) + (\text{ХПт} - \text{ХПк})),$$

где X_{Pa+t} - процент клеток с хромосомными aberrациями после облучения адаптирующей и тестируемой дозами; X_{Pa} - процент клеток с aberrациями после облучения только адаптирующей дозой; X_{Pt} - процент клеток с aberrациями после облучения только тестирующей дозой; X_{Pk} - процент хромосомных aberrаций у необлученных клеток (контроль).

При $КАО = 1$ АО не обнаружен; при $КАО < 1$ клетки проявляют АО; при $КАО > 1$ предварительное облучение в малой дозе повышает эффективность последующего тестируемого облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рисунок отражает зависимость количества клеток с хромосомными aberrациями от дозы после облучения клеток китайского хомячка и меланомы. Как видно, зависимость доза - эффект для обеих линий клеток имеет сходный характер. Количество клеток с хромосомными aberrациями увеличивается в диапазоне 0 - 20 и 0 - 10 сГр на клетках линии V-79 и BRO соответственно (фаза ГЧ), после чего наблюдается резкое снижение их числа, особенно сильно выраженное на клетках меланомы - при дозе 20 сГр процент клеток меланомы с aberrациями ниже контрольного уровня. Таким образом, в диапазоне 10 - 50 сГр и 20 - 50 сГр для обеих линий клеток отсутствует линейная зависимость, и даже наблюдается снижение числа клеток с aberrациями с ростом дозы. При дальнейшем увеличении дозы зависимость доза - эффект носит линейный характер (фаза ИР), однако наклон кривой в диапазоне высоких доз в 2 - 3 раза меньше, чем на первоначальном участке ГЧ. По-видимому, нарушение линейности и уменьшение наклона кривой связано с индукцией процессов репарации при определенном уровне повреждения клеток.



Зависимость выхода клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения.

1 - клетки меланомы; 2 - клетки китайского хомячка.

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

Сопоставление кривых доза - эффект двух клеточных линий дает основание полагать, что индуцированные системы репарации клеток меланомы запускаются при меньших дозах и работают более эффективно, чем у клеток китайского хомячка.

Известно, что для индукции АО требуется 4 - 6 ч [18, 26]. В связи с этим на клетках китайского хомячка нами были использованы две схемы облучения: интервал между адаптирующей и тестируемой дозой всегда составлял 5 ч, время фиксации после облучения в тестируемой дозе - 2 и 5 ч. Кроме того, исследовали влияние величины адаптирующей и тестируемой доз на степень выраженности АО.

В табл. 1 в качестве примера приведены результаты одного эксперимента на клетках китайского хомячка по выявлению с помощью цитологического критерия зависимости индукции АО от дозы предварительного облучения при времени фиксации 5 ч после тестируемого облучения. Установлено, что с увеличением адаптирующей дозы от 1 до 20 сГр процент клеток с хромосомными aberrациями растет и при дозе 20 сГр достоверно отличается от контрольного уровня, что полностью соответствует результатам, полученным при изучении зависимости доза - эффект (рисунок). При предварительном облучении в дозе 1 сГр АО, рассчитанный по приведенной выше формуле, практически не выявляется; при адаптирующей дозе 20 сГр величина КАО составляет 0,46.

Средние значения КАО, полученные на клетках китайского хомячка в разных условиях воздействия, представлены в табл. 2. Сопоставление КАО дает основание утверждать, что, во-первых, АО наиболее выражен при предварительном облучении в дозе 20 сГр; во-вторых, эффективность АО практически не зависит от величины повреждающей дозы в диапазоне 0,5 - 1,5 Гр; в-третьих, АО проявляется на клетках, делящихся через 5 ч, и отсутствует на клетках, делящихся через 2 ч после облучения в

Таблица 1

Цитогенетические повреждения и адаптивный ответ при облучении клеток китайского хомячка в адаптирующей дозе 1, 5 и 20 сГр и тестируемой дозе 100 сГр (время фиксации 5 часов)

Облучение		Клетки с хромосомными aberrациями, %	КАО
Доза адapt., сГр	Доза тест., 100 сГр		
-	-	8,4±0,7	0,95±0,007
-	+	21,0±0,9	
1	-	9,3±0,8	
1	+	21,3±1,1	0,86±0,01
5	-	10,3±1	
5	+	21±1	0,46±0,009
20	-	14,5±1	
20	+	17±0,9	

Таблица 2

Зависимость КАО на клетках китайского хомячка от величины адаптирующей и тестируемой дозы

Время фиксации, ч	Тестируемая доза, сГр	КАО при адаптирующих дозах, сГр		
		1	5	20
5	50	-	-	0,48 ± 0,01
	100	0,82±0,2	0,82 ± 0,07	0,56 ± 0,08
	150	-	-	0,54 ± 0,02
2	100	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,08

тестируемой дозе. Отсутствие АО в этом случае, вероятно, связано с тем, что 2 ч (а учитывая длительность самого митоза - 1,5 ч) - слишком короткое время для репарации хромосомных повреждений, возникших после тестируемого облучения. Как показано на лимфоцитах периферической крови [13], при использовании 3-аминобензамида, блокирующего репарацию хромосомных повреждений, АО реализуется в течение 4-х ч после облучения в тестируемой дозе.

При изучении индукции АО на клетках меланомы человека, на основании данных, полученных на клетках китайского хомячка, была использована схема облучения, с помощью которой были выявлены оптимальные условия для его реализации. Интервал между адаптирующей и тестируемой дозами составлял также 5 ч; учитывая большую длительность митотического цикла клеток меланомы по сравнению с клетками китайского хомячка, фиксацию проводили через 8 ч после тестируемого облучения. Были проведены две серии экспериментов, в которых способность клеток к АО определяли через 24 и 48 ч после начала культивирования клеток.

В опытах на клетках, культивируемых в течение 24 ч, установлено, что АО регистрируется в диапазоне адаптирующих доз 1 - 20 сГр; максимальный АО выявляется при предварительном облучении в дозе 1 сГр и тестируемых дозах 0,5 и 1 Гр. Облучение в дозе 30 сГр несколько усиливает действие последующей большей дозы (табл. 3).

При определении КАО на клетках меланомы, культивируемых в течение 48 ч при всех адаптирующих дозах имеет место значительное повышение эффективности облучения в тестируемой дозе 1 Гр (табл. 3). Этот факт можно объяснить тем, что в процессе длительного культивирования, несмотря на то, что клетки продолжают активно делиться, вследствие накопления метаболитов и изменения рН среды создаются условия, не оптимальные для индукции АО. Эти результаты

Таблица 3

Зависимость КАО на клетках меланомы человека от величины адаптирующей и тестируемой дозы в условиях различной длительности культивирования

Длительность культивирования клеток, ч	Тестируемая доза, сГр	КАО при адаптирующих дозах, сГр			
		1	10	20	30
24	50	0,52 ± 0,006	0,85 ± 0,003	0,7 ± 0,04	1,12 ± 0,01
	100	0,45 ± 0,09	0,77 ± 0,16	0,71 ± 0,04	1,23 ± 0,052
	200	0,78 ± 0,02	0,88 ± 0,09	0,78 ± 0,2	0,99 ± 0,075
48	100	1,15 ± 0,4	1,4 ± 0,17	1,4 ± 0,3	-

согласуются с имеющимися данными [26] о модификации АО при изменении состава и рН среды.

Представленные результаты можно суммировать следующим образом. АО проявляется в узком диапазоне адаптирующих доз с экстремумом в очень узкой области доз, различающемся для разных типов клеток. Для реализации АО требуется время порядка 5 ч. АО индуцируется в оптимальных для клеток физиологических условиях и зависит от состава среды. Кроме того, эксперименты по изучению способности двух линий клеток к АО подтвердили предположения, сделанные на основании анализа дозовой зависимости выхода цитогенетических повреждений, о большей эффективности индуцибельных процессов репарации у клеток меланомы. Действительно, на клетках меланомы максимальный АО выявляется в большей степени и при более низкой адаптирующей дозе (1 сГр), чем на клетках китайского хомячка (20 сГр). Все это дает основание утверждать, что переход от ГЧ к ИР,

показанный при изучении зависимости доза - эффект по выходу цитогенетических повреждений, обусловлен включением процессов индуцибельной репарации при определенном уровне повреждения и по своим механизмам и проявлению, в том числе и в количественном отношении, аналогичен адаптивному ответу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pohl-Ruling J., Fisher P., Haas O. et al. // *Mutat. Res.* 1983. V. 110 N.1. P. 71-82.
2. Lloyd D.C., Edwards A., Leonard A. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1988 V. 53. N.1. P. 49-55
3. Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al. // *Int. j. Radiat. Biol.* 1992. V. 61. P. 335-343.
4. Лучник Н.В. // *Биофизика.* 1957. Т. 2. Вып.1. С. 86-93.
5. Luchnik N.V. // *Radiat. Environ. Biophys.* 1975. V 12. N.3. P. 197-204.
6. Гераськин С.А. // *Радиация биология. Радиоэкология.* 1995. Т. 35. Вып.5 С. 563-571.
7. Заичкина С.И., Аптикаева Г.Ф., Ахмадиева А.Х. 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. Marples B., Joiner M.C. // *Radiat. Res.* 1993. V. 133. P. 41-51.
10. Puck T.T., Marcus P.I. // *J. Exp. Med.* 1956. V. 103. P. 653-666.
11. Joiner M.C., Lambin P., Malaise E.P. et al. // *Mutat. Res.* 1996. V.358. P. 171-183.
12. Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. // *Science.* 1984. V.223. P. 549-597.
13. Wiencke J.K., Afzal V., Olivieri G., Wolff S. // *Mutagenesis.* 1986. V.1. P. 375-380.
14. Wolff S., Afzal V., Wiencke J. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1988. V.53 P. 39-48.
15. Shadley J.D., Wolff S. // *Mutagenesis.* 1987. V. 2. P. 95-96.
16. Shadley J.D., Wiencke J. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1989. V. 56. N.1. P.107-118.
17. Ikushima T. // *Mutat. Res.* 1987. V. 180. P. 215-221.
18. Ikushima T. // *Mutat. Res.* 1989. V. 227. P. 241-246.
19. Гильяно Н.Я., Большакова О.И., Лаврова Г.А. и др. // *Радиация биология. Радиоэкология.* 1998. Т.38. Вып.5. С.663-670.
20. Hiendorff K., Rieger R., Michaelis A., Takehisa S. // *Mutat. Res.* 1987. V. 190. P. 131-135.
21. Эйдус Л.Х. // *Радиация биология. Радиоэкология.* 1996. Т. 36. Вып.6. С. 874-882.
22. Shadley J.D., Afzal V., Wolff S. // *Radiat. Res.* 1987. V. 111. P. 511-517.
23. Vijayalaxmi A., Burkart W. // *Mutat. Res.* 1989. V. 211. N.1. P. 1-5.
24. Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А. // *Радиация биология. Радиоэкология.* 1998. Т. 38. Вып. 6. С. 841-847.
25. Рябченко Н.И., Антошина М.М., Насонова В.А., Фесенко Э.В. // *Радиация биология. Радиоэкология.* 1995. Т. 35. Вып. 5. С. 670-675. P.133-143.
26. Kurihara J., Reinkjarn M., Eton H. // *J. Radiat. Res.* 1992. V. 33. P. 267-274.
27. Bosi A., Micheli A., Pietrosanti S. et al. // *Mutat. Res.* 1991. V. 250. P. 325-329.

Рукопись поступила в издательский отдел
8 декабря 1999 года.