УДК 599.323.4-116:575:539.16:537.531

### ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА В КЛЕТКАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛОЙ ДОЗЕ И ИХ ПОТОМКОВ

### Раскоша О.В.

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

В модельных экспериментах изучена стабильность генома клеток щитовидной железы мышей линии Af (n = 116) после хронического облучения в малой дозе (0,3 Гр) и прослежена возможность наследования радиационно-индуцированных изменений у их необлученных потомков ( $F_1$ - $F_4$ ). Результаты показали статистически значимое снижение двунитевых разрывов ДНК в тироцитах животных через четыре месяца после радиационного воздействия, при этом частота клеток с микроядрами сохранялась в пределах нормы. Тесты с химической (уретан, 1 мг/г массы тела) и радиационной (острое гамма-облучение в дозе 4 Гр) нагрузками позволили обнаружить различия на молекулярном уровне в геноме клеток ЩЖ между потомками животных  $F_4$  опытной и контрольной групп. В целом, данные, полученные на потомках облученных животных, свидетельствуют в пользу наследования радиационно-индуцированной нестабильности генома.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, малые дозы, хроническое воздействие, острое облучение, уретан, щитовидная железа, микроядра, двунитевые разрывы ДНК

### ESTIMATION OF GENOME STABILITY IN THYROID CELLS OF MICE AFTER CHRONIC EXPOSURE TO IONIZING RADIATION IN LOW DOSES, AND THEIR OFFSPRING WITHOUT IRRADIATION

### Raskosha O.V.

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

In model experiments, we studied the stability of the genome of the cells of the thyroid gland mouse line Af, who were chronic exposure at low dose (0,3 Gy) and traced the possibility of inheritance of radiation-induced changes in their unexposed offspring ( $F_1$ - $F_4$ ). In the experiment were used 116 animals. The results showed a statistically significant decrease in DNA double strand breaks ( $p \le 0,05$ ) in thyroid cells irradiated animals, the frequency of cells with micronuclei was within normal limits. Tests with the chemical (urethane, 1 mg/g body weight) and radiation (a dose of 4 Gy) loads showed differences at the molecular level in the genome of cells thyroid gland of  $F_4$ -offspring animal control and experimental groups. In general, the data obtained in the progeny of irradiated animals, according to the inheritance of radiation-induced genomic instability.

## Keywords: ionizing radiation, low-dose, chronic exposure, acute exposure, urethane, thyroid, micronuclei, DNA double strand breaks

В природных условиях выявление особенностей биологического действия радиационного фактора является довольно сложной задачей в связи с модифицирующим влиянием сопутствующих физических и химических факторов, которые в значительной степени могут изменять зависимость «доза – эффект» для организмов, населяющих территории с повышенным радиационным фоном. В таком случае наиболее приемлемым является проведение модельных экспериментов на лабораторных животных, позволяющих строго стандартизировать условия воздействия, соблюдение которых необходимо для оценки генетических последствий как у непосредственно облученных животных, так и у их потомства. Перспективным для изучения биологических эффектов длительного воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в малых дозах нам представляется исследование ответной реакции щитовидной железы (ЩЖ), которая состоит преимущественно из медленно

обновляющихся клеточных популяций. По данным литературы ткани с низкой пролиферативной активностью способны на протяжении длительного времени сохранять и накапливать структурные изменения ДНК, связанные с влиянием различных повреждающих факторов [1, 2].

Существует ряд методов, позволяющих оценить результаты воздействия малых доз ИИ на живые организмы как на клеточном (микроядерный тест), так и на молекулярном (метод «ДНК-комет») уровнях. Микроядерный тест, основанный на подсчете интерфазных клеток с микроядрами (МЯ), широко распространен для оценки мутагенного действия радиационного загрязнения среды и в экспериментах по выявлению радиационно-индуцированных эффектов в разных дозах. С появлением метода «ДНК-комет» стало возможным исследовать повреждения ДНК в индивидуальных клетках, определяя их количественно, и выявлять, таким образом разнородность

ответа клеток на генотоксическое воздействие [5]. Есть мнение, что по чувствительности этот метод сопоставим с традиционными цитогенетическими тестами, а в случаях, когда низкие дозы сочетаются с большой длительностью воздействия фактора, может даже превосходить их [6].

Цель исследования. Цель работы состояла в оценке стабильности генома фолликулярных клеток ЩЖ у мышей линии Af, облученных в хроническом режиме в малой дозе (0,3 Гр), а также в том, чтобы проследить возможность наследования радиационно-индуцированных изменений у их потомков ( $F_1$ - $F_4$ ).

### Материалы и методы исследования

Эксперименты с моделированием ситуации хронического у-излучения проводили на половозрелых мышах линии Af (F<sub>0</sub>). Источником ү-излучения служили две ампулы, содержащие 0,474 · 10<sup>6</sup> и 0,451 · 10<sup>6</sup> кБк <sup>226</sup>Ra, разнесенные на расстояние 2,5 м. Животные находились под воздействием ИИ в течение 84 суток при мощности экспозиционной дозы 150 мкГр/ч, суммарная поглощенная доза за этот период составила 0,3 Гр (опытная группа). Дозовая нагрузка на организм опытных животных определялась мощностью экспозиционной дозы (радиометр ДРГЗ-01Т1) и сроками их содержания в условиях воздействия ИИ. Суммарную поглощенную дозу облучения рассчитывали по показаниям термолюминесцентных дозиметров (ДТУ-01) с детекторами ДТГ-4 (LiF) на дозиметрической термолюминесцентной установке ДВГ-02ТМ (НПП «Доза», Россия). Через четыре месяца после прекращения облучения мышей (F<sub>0</sub>) (8-9 мес., масса тела 24-28 г) декапитировали с последующим взятием материала для молекулярного и цитогенетического анализов ЩЖ. Для получения потомства первого-четвертого поколений (F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub>) облученных самцов спаривали с облученными самками (один самец на одну/две самки), при этом учитывали их родословную, подбирая неродственных животных. Мыши контрольных групп были посажены на размножение одновременно с соответствующими группами опытных животных в идентичные условия. Для выявления возможности наследования радиационно-индуцированных изменений полученных самцов-потомков (F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub>) (3 мес., масса тела 20-27 г) декапитировали с последующим взятием материала для исследования генома клеток ЩЖ. На животных F4 был проведен дополнительный эксперимент с радиационной (острое гамма-облучение) и нерадиационной (уретан (этилкарбамат)), Sigma-Aldrich, USA) нагрузками. Потомков мышей случайным образом делили на три группы, в каждую входили потомки как опытной, так и контрольной групп животных. Первая группа состояла из мышей, которых не подвергали воздействию факторов («без воздействия»), вторую группу животных подвергали острому облучению в дозе 4 Гр на установке «Исследователь» при мощности дозы 0,75 Гр/мин («облучение 4 Гр») и третьей группе животных («уретан») внутрибрюшинно вводили 10% раствор уретана в количестве 1 мг/г массы тела (контрольная группа мышей аналогичным образом получала эквивалентное массе тела количество 0,9% раствора NaCl). Уретан является одним из широко исследованных канцерогенов-промоторов, который проявляет свою эффективность в трансгенерационных канцерогенных исследованиях [7, 9]. Животных выводили из эксперимента через 48 часов после воздействий. Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77, № 755).

Суспензию клеток ЩЖ получали с помощью ферментативной диссоциации путем обработки ткани в 0,25% растворе коллагеназы (Collagenase type IA, Sigma, USA), время инкубации составляло 40-60 мин. Для проведения микроядерного теста в полученные суспензии клеток добавляли гипотонический раствор (0,56% KCl, 20 мин, 37°C) с последующей фиксацией охлажденной смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), после чего суспензию клеток раскапывали на холодные предметные стекла. Для изучения степени фрагментации ДНК использовали нейтральную версию рН метода ДНК-комет, которая ориентирована преимущественно на анализ двунитевых разрывов ДНК (ДР ДНК) [10]. Суспензии клеток смешивали с 1% раствором легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma, USA) и наносили на предварительно покрытые 1% нормоплавкой агарозой предметные стекла. Лизис клеток осуществляли в холодном (4°С) лизирующем буфере (2,5 М NaCl. 100 MM Na, EDTA, 20 MM Tris-HCl, pH 10, 1% Triton X-100 и 10% DMSO) в течение 24 ч. Далее слайды переносили на 20 мин в трис-боратный буфер (pH 8,2, при 4 °C) с последующим проведением электрофореза в этом же буфере при напряжении 1 В/см при 4 °С в течение 20 мин. Для фиксации слайдов использовали 70°этанол (10 мин). Генетический материал для микроядерного теста и метода ДНК-комет окрашивали акридиновым оранжевым («Sigma», USA; 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Число клеток с МЯ подсчитывали на 1 тыс. клеток под флуоресцентным микроскопом «Axioscop» (Carl Zeiss, Jena). «ДНК-кометы» визуализировали с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры «AxioCam» при флуоресцентном режиме, длина волны возбуждающего света составляла 450-490 нм (запирающий фильтр 510 нм). Обработку микрофотографий выполняли с помощью программного обеспечения «CometScore 1.5» (TriTek Corp., USA), анализировали по 50-100 «комет» на одно животное. Долю повреждений ДНК в клетках оценивали с помощью показателя «Olive tail moment» (ОТМ) по [10], который равен произведению расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста «кометы» и процента ДНК в хвосте. Рассчитывали также среднее значение %TDNA, отражающий процент ДНК в хвосте «кометы» [8] и частоту распределения тироцитов по величине %TDNA. Вычисляли средние значения частоты клеток с неповрежденной ДНК (практически не имеющие хвоста «кометы») и с высоко фрагментированной ДНК (имеющие более 40% ДНК в хвосте «кометы») [3]. О достоверности различий судили по величине t-критерия Стьюдента.

# Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного эксперимента показали, что через четыре месяца после хронического воздействия ИИ в дозе 0,3 Гр на мышей линии  $Af(F_0)$  частота клеток с МЯ в ЩЖ была в пределах значений, характерных для контрольных животных (табл. 1). При сравнительном изучении потомков  $(F_1-F_4)$ , полученных от облученных и необлученных животных, различий по частоте встречаемости микронуклеированных тироцитов также не обнаружено. Статистически значимые изменения после воздействия ИИ на мышей были выявлены на молекулярном уровне, которые проявлялись в понижении доли ДР ДНК в клетках ЩЖ (по показателю ОТМ). На рис. 1 продемонстрировано повышение количества тироцитов у животных после радиационного воздействия в диапазонах 11-20 и 21-30% ТДЛА и снижение доли клеток с высоко фрагментированной ДНК (диапазон – более 40% TDNA по сравнению с необлученными животными. Кроме того, следует отметить возрастание доли клеток элиминирующих по пути апоптоза у облученных животных над спонтанным уровнем (диапазон 90-100%TDNA). Это повлияло на понижение среднего значения частоты встречаемости тироцитов с высоко фрагментированной ДНК у животных после действия ИИ. Малые дозы облучения могли явиться адаптирующим фактором и вызвать снижение индукции разрывов нитей ДНК в клетках ЩЖ по сравнению с нормой путем активации процессов репарации, а с другой стороны, повышенная элиминация клеток с запрограммированной гибелью способствовала удалению из клеточной популяции клеток с поврежденным геномом.

Чтобы определить значимость для потомства изменений, обнаруженных на молекулярном уровне в геноме клеток ЩЖ у облученных мышей, были продолжены исследования на животных  $F_1$ - $F_4$ поколений. В результате изучения степени фрагментации ДНК в тироцитах потомков облученных животных выявлены статистически значимые различия с контролем в  $F_2$ -поколении; у мышей опытной группы частота встречаемости клеток с ДР ДНК была ниже спонтанного уровня (ОТМ в 1,8 раза; %TDNA в 1,3 раза), как

### Таблица 1

Поко- ление	Группа животных (число животных)	МЯ, ‰	ОТМ, усл. ед.	%TDNA	Клетки с не- поврежден- ной ДНК, %	Клетки с высо- кофрагментиро- ванной ДНК, %
F <sub>0</sub>	контрольная (11)	8,0 ± 0,2	$22,1 \pm 1,8$	$31,7 \pm 1,0$	$18,59 \pm 1,1$	$33,3 \pm 1,3$
Ŭ	опытная (6)	9,0 ± 0,2	$13,5 \pm 1,8*$	$30,4 \pm 1,0$	$16,79 \pm 2,0$	$21,3 \pm 2,2*$
F <sub>1</sub>	контрольная (5)	$5,5 \pm 0,1$	$9,2 \pm 1,4$	$15,8 \pm 0,8$	$42,6 \pm 2,9$	$5,2 \pm 1,3$
	опытная (7)	$6,8 \pm 0,9$	$9,0 \pm 1,0$	$15,7 \pm 0,7$	$46,6 \pm 2,1$	$4,8 \pm 0,9$
F <sub>2</sub>	контрольная (5)	$3,8 \pm 0,7$	$7,9 \pm 1,1$	$14,2 \pm 0,6$	$44,9 \pm 2,9$	$2,7 \pm 0,9$
_	опытная (6)	$4,7 \pm 1,2$	$4,5 \pm 0,3*$	$10,7 \pm 0,4*$	$58,9 \pm 2,5*$	$0,5 \pm 0,4*$
F <sub>3</sub>	контрольная (7)	$4,1 \pm 0,7$	$5,1 \pm 0,9$	$12,3 \pm 0,4$	$53,1 \pm 2,1$	$1,5 \pm 0,5$
	опытная (7)	$5,5 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,4$	$11,4 \pm 0,5$	66,0 ± 2,1*	$1,2 \pm 0,5$
F <sub>4</sub>	контрольная (10)	$4,1 \pm 0,7$	$6,3 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,4$	$53,0 \pm 1,9$	$3,5 \pm 0,7$
	опытная (10)	$4,6 \pm 0,6$	5,4 ± 0,6	$13,1 \pm 0,4$	$55,4 \pm 2,1$	$4,4 \pm 0,9$

Молекулярные и цитогенетические показатели клеток ЩЖ мышей линии Af после хронического облучения в дозе 0,3 Гр и их необлученных потомков

П р и м е ч а н и е . Здесь и далее \*р ≤ 0,05 по сравнению с соответствующей контрольной группой.



Рис. 1. Гистограмма распределения тироцитов по величине % TDNA у мышей линии Af после хронического гамма-облучения в дозе 0,3 Гр. Примечание. Светлые столбики – контрольные животные (контрольная группа),

темные столбики – облученные животные (опытная группа)

50

и у непосредственно облученных особей (ОТМ в 1,6 раза). В других поколениях, полученных от облученных животных – F<sub>1</sub>  $F_3$  и  $F_4$  средние значения % TDNA, OTM, количества клеток с неповрежденной (кроме F<sub>3</sub>) и высоко фрагментированной ДНК в клетках ЩЖ практически не отличались от контроля. На рис. 2 показано сходство частоты распределения ДНК в хвосте «кометы» в клетках ЩЖ у потомков F<sub>1</sub> и F<sub>4</sub> облученных и контрольных мышей, тогда как у потомков F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> облученных животных проявлялось статистически значимое повышение относительно нормы доли клеток с неповрежденной ДНК (в обоих поколениях на 14% в диапазоне 0–10%TDNA).

фрагментации ДНК может быть связано с активацией репарационных процессов, возникающей в ответ на повреждающее действие факторов. Следует отметить, что в условиях проведенного эксперимента была выявлена следующая особенность низкое относительно нормы количество ДР ДНК у животных, которых впервые подвергали действию облучения или уретана, их предки тоже не испытывали подобного воздействия. Различий в числе клеток с МЯ в ЩЖ потомков облученных и необлученных животных через 48 часов после действия обоих факторов не обнаружено. Это связано с тем, что для формирования МЯ в клетках ЩЖ, органе



Рис. 2. Гистограмма распределения тироцитов по величине %TDNA у потомков (F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub>) мышей линии Af, облученных в дозе 0,3 Гр. Примечание. Светлые столбики – потомки животных контрольной группы, темные столбики – потомки животных опытной группы

Выявление резервных возможностей исследуемого органа, проведенное на F<sub>4</sub>поколении животных с помощью острого облучения (4 Гр) позволило обнаружить различия в ответной реакции ЩЖ у потомков опытной и контрольной групп (табл. 2). У потомков облученных мышей после воздействия ИИ в острой дозе повышалась индукция ДР ДНК в тироцитах. Об этом свидетельствует увеличение интегрального показателя ОТМ и среднего значения %TDNA, происходившие за счет роста количества клеток с высоко фрагментированной ДНК (в 2 раза; р ≤ 0,05). У потомков контрольных животных ответная реакция была противоположной – после острого облучения статистически значимо повышалось среднее значение числа клеток в ЩЖ с неповрежденной ДНК, что отразилось на %TDNA. После воздействия уретана обнаружено понижение доли тироцитов с ДР ДНК у потомков как контрольных, так и облученных животных ( $p \le 0.05$ ). Снижение степени

с низкой пролиферативной активностью необходим длительный промежуток времени после действия факторов или/и влияние самих факторов должно быть более продолжительным. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные нами ранее [4].

### Заключение

Результаты изучения радиационноиндуцированных эффектов в модельных экспериментах на мышах линии Af и сопоставление их с ланными о наследуемости таких изменений позволили сделать заключение о биологической эффективности хронического воздействия ИИ в дозе 0,3 Гр. Примененные нами тесты с химической (уретан) и радиационной (острое облучение) нагрузками показали, что на молекулярном уровне реактивность ЩЖ потомков (F<sub>4</sub>) животных контрольной и опытной групп в ответ на радиационное воздействие различается, тогда как при уретановой интоксикации прослеживается

51

### Таблица 2

Молекулярные и цитогенетические показатели клеток ЩЖ
у F <sub>4</sub> -потомков опытной и контрольной групп мышей линии Af
через 48 часов после острого облучения (доза 4 Гр) или воздействия уретаном (1 мг/г)

Потомки F <sub>4</sub>	Вариант экспе- римента (число животных)	МЯ, ‰	ОТМ, усл. ед.	%TDNA	Клетки с не- поврежден- ной ДНК, %	Клетки с вы- сокофраг- ментирован- ной ДНК, %
Контрольная	без воздействия (10)	$4,1 \pm 0,7$	$6,3 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,4$	$53,0 \pm 1,9$	$3,5 \pm 0,7$
группа	облучение (6)	$4,0 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,3$	$11,8 \pm 0,7*$	$64,1 \pm 2,3*$	$3,2 \pm 0,8$
	уретан (10)	$4,6 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,3*$	9,1 ± 0,5*	73,7 ± 2,1*	$1,5 \pm 0,6*$
Опытная	без воздействия (10)	$4,6 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,6$	$13,1 \pm 0,4$	$55,4 \pm 2,1$	$4,4 \pm 0,9$
группа	облучение (6)	$4,5 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,4*$	$15,3 \pm 0,8*$	$56,9 \pm 2,5$	$8,9 \pm 1,5*$
	уретан (10)	$5,6 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,5$	$10,4 \pm 0,3*$	$65,5 \pm 1,7*$	$1,1 \pm 0,4*$

Примечание. \*p ≤ 0,05 по сравнению с группой «без воздействия».

сходство в ответной реакции клеток ЩЖ у животных обеих групп (понижение доли ДР ДНК). Выявленное после острого облучения изменение индукции тироцитов с ДР ДНК косвенно может свидетельствовать о различиях в скорости развития репарационных процессов в геноме клеток потомков облученных и необлученных животных. Результаты, полученные на потомках, в целом могут свидетельствовать в пользу наследования радиационно-индуцированной нестабильности генома.

#### Список литературы

1. 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.

2. Гансбургский М.А. Анализ клеток с микроядрами в оценке пролиферации эпителия щитовидной железы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 21 с.

 Кузнецова Е.А., Заичкина С.И., Сирота Н.П. и др. Индукция редко- и плотноионизирующими излучениями повреждений ДНК в лейкоцитах крови и цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костно-

го мозга мышей и их потомков // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54. – № 4. – С. 341–349.

4. Раскоша О.В., Ермакова О.В., Павлов А.В., Кораблева Т.В. Морфометрические и цитогенетические исследования фолликулярного эпителия щитовидной железы мелких млекопитающих при хроническом облучении в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55. – № 1. – С. 63–70.

5. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода «ДНК-комет» в радиобиологических исследованиях // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50. – № 3. – С. 329–339.

6. Сорочинска У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки поврежденией ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. – 2008. – Т. 10. – Вып. 3. – С. 303–309.

7. Vorobtsova I.E., Kitaev E.M. Urethane-induced lung adenomas in the first-generation progeny of irradiated male mice // Carcinogenesis. – 1988 – Vol. 9. – P. 1931–1934.

8. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G. et al. The comet assay: topical issues // Mutagenesis. – 2008. – Nº 23. – P. 143–151.

9. Nomura T. X-ray induced germ-line mutation leading to tumors; its manifestation in mice given urethane postnatally // Mutat. Res. -1983. -Vol. 11. -P. 59–65.

10. Olive P.L., Banath J.P. Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: «tail moment» as a function of position in the cell cycle // Mutat Res. (DNA Repair). – 1993. – Vol. 294. – P. 275–283.