

## Оцінка генотоксичності пухлинного росту в попередньо опроміненому малими дозами організмі

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, І. О. Шмараков, Л. В. Блинда

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
Вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, Україна, 58000

igor\_shmarakov@mail.ru

**Мета.** Встановити рівень стабільності ядерної ДНК печінки та лімфоцитів крові в організмі з карциномою Герена, яка розвивається на фоні фракціонованого рентгенівського опромінення малими дозами. **Методи.** Мікроелектрофорез ДНК індивідуальних клітин, електрофорез тотальної і фрагментованої ядерної ДНК, спектрофотометричне титрування комплексів ДНК з піроїном G. **Результати.** Порушення молекулярної цілісності ядерної ДНК печінки та лімфоцитів крові на початкових етапах після фракціонованого опромінення організму малими дозами має односпрямований характер, найвираженіший у лімфоцитах крові опромінених тварин, та проявляється у зростанні частки фрагментів розмірами 10–50 тис. п. н. та від 2 тис. п. н. Індуковані радіацією пошкодження ядерної ДНК клітин печінки і лімфоцитів опроміненого організму із злоякісним новоутворенням проявляються з високою часткою деструктивності лише на термінальних етапах росту карциноми Герена та найвираженіші в печінці опромінених пухлиноносіїв. **Висновки.** Виявлена нестабільність ядерної ДНК лімфоцитів і печінки об'єктивно унеможливило їхнє повноцінне функціонування, що може сприяти інтенсифікації онкогенезу в опроміненому організмі, а також бути причиною підвищення генотоксичності хіміопрепаратів при спробах елімінації злоякісного новоутворення.

*Ключові слова:* ядерна ДНК, печінка, лімфоцити, генотоксичність.

**Вступ.** Інтенсивність неопластичного процесу *in vivo* носить автономний характер і визначається можливостями організму функціонувати за умов метаболічного дисбалансу та імунодепресії [1]. У цьому аспекті важливого значення набуває повноцінна метаболічна активність клітин печінки як основного гомеостатичного органу [2] та лімфоцитів – як компонента клітинної ланки імунітету [3], що значною мірою залежить від стабільності їхнього геному та стійкості до генотоксикантів.

Водночас значна частка онкологічних захворювань на сьогодні виникає і протікає за умов фонового рівня радіації, генотоксичний та канцерогенний потенціал якої є беззаперечним [4]. При цьому основні протипухлинні стратегії спрямовані на порушення геному малігнізованих клітин протипухлинними хіміопрепаратами, побічним ефектом яких є підвищення нестабільності ядерної ДНК нормальних клітин організму [5]. Однак практично відсутня інформація стосовно генотоксичності пухлинного росту в організмі, що зазнав опромінення малими дозами радіації, та стабільності ядерної ДНК печінки і лімфоцитів за цих умов.

Мета роботи – встановити рівень стабільності ядерної ДНК печінки та лімфоцитів крові в організмі з карциномою Герена, яка розвивається на фоні фракціонованого рентгенівського опромінення малими дозами.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 110–130 г, яких розділяли на групи: I – опромінені тварини (Р); II – тварини, яким трансплантували пухлинні клітини (П); III – тварини, яким по закінченні 7-добового опромінення трансплантували пухлинні клітини (Р + П); IV – контрольна, до якої входили інтактні щури (К).

Попереднє опромінення проводили перед трансплантацією карциноми Герена протягом 7 діб у світловий період в дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (13 сГр) через кожні 24 год на рентгенівській діагностичній установці 12П6 («Lachema», Чехія). Потужність дози становила  $2,5810^{-4}$  Кл/кг (0,93 сГр), напруга – 70 кВ, сила струму 40 мА (фільтри – 0,5 мм Си, фокусна відстань – 40 см). Тварин опромінювали групами при вільному утриманні в клітці. Щури перебували на стандартному раціоні віварію і мали постійний доступ до води. Карциному Герена трансплантували, вводячи підшкірно у ділянку стегна 0,4 мл 30 %-ї суспензії пухлинних клітин у фізіологічному розчині. Евтаназію тварин під легким ефірним наркозом та дослідження виконували на різних етапах онкогенезу, які для карциноми Герена припадають на 7-му (латентний період онкогенезу), 14-ту (логарифмічний) та 21-шу (стаціонарний) доби експерименту. Для досліджень використовували печінку і лімфоцити щурів. Лімфоцити виділяли за методом [6]. Відсоток мертвих клітин визначали в аліквоті за допомогою тесту з трипановим синім (кінцева концентрація 0,1 %).

Виділення ядерної фракції, тотальної і фрагментованої ядерної ДНК та її електрофоретичний аналіз проводили за раніше описаними методами [7]. Як стандарт високомолекулярної ДНК використано ДНК тимусу теляти («Serva», Німеччина). Гелі сканували на приладі GelDoc 2000 та вивчали, застосовуючи програму Quantity One («BioRad», США).

Рівень низькомолекулярних і високомолекулярних фрагментів розраховували як відсоток

мігруючої у гелі ДНК по відношенню до загальної кількості ДНК треку [8].

Характер пошкодження ядерної ДНК печінки аналізували, порівнюючи криві спектрофотометричного титрування комплексів ДНК з піроніном G у широкому діапазоні співвідношень Р/D (Р – загальна концентрація негативно заряджених фосфатних груп, D – загальна концентрація барвника) за методом [9].

Мікроелектрофорез ДНК індивідуальних лімфоцитів крові здійснювали, як у роботі [10]. Комети після фотографування гелів при збільшенні у 400 разів з використанням CCD-камери поділяли на п'ять класів залежно від відсотка ДНК у «хвості» комети [11] та аналізували за допомогою програми TriTek CometScore™. Для максимально об'єктивної оцінки пошкодження ДНК розраховували показник «моменту хвоста» як добуток параметрів довжини «хвоста» і відсоткового вмісту ДНК у «хвості», поділений на 100 %; також розраховували індекс «ДНК-комет», який визначали за формулою

$$I_{\text{дк}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / ,$$

де  $n_0 - n_4$  – кількість «ДНК-комет» кожного типу; – сума підрахованих «ДНК-комет» [12]. Статистичну оцінку результатів проводили з використанням *t*-критерію Ст'юдента, коли величини вибірки мали нормальний розподіл; у разі відсутності нормального розподілу величин використовували непараметричні критерій Даннета та критерій Краскела-Уоліса. Достовірними вважали різниці при  $p < 0,05$ .

**Результати і обговорення.** Використання фракціонованого рентгенівського опромінення у щоденній дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (13 сГр), що моделює фоновий рівень низьких доз радіації, у досліджуваних клітинах організму спричиняє появу класичних для апоптозу [11, 13] біохімічних і морфологічних змін. У клітинах печінки та лімфоцитах зростає рівень розривів ДНК і посилюються процеси її фрагментації, які носять дискретний характер (рис. 1, а). Розмір основної частки фрагментованої ДНК становив від 10 до 50 тис. п. н. (30 % у лімфоцитах, 15,8 % у ядрах клітин печінки) (рис. 2, а). Утворення фрагментів розмірами від 10 до 50 тис.

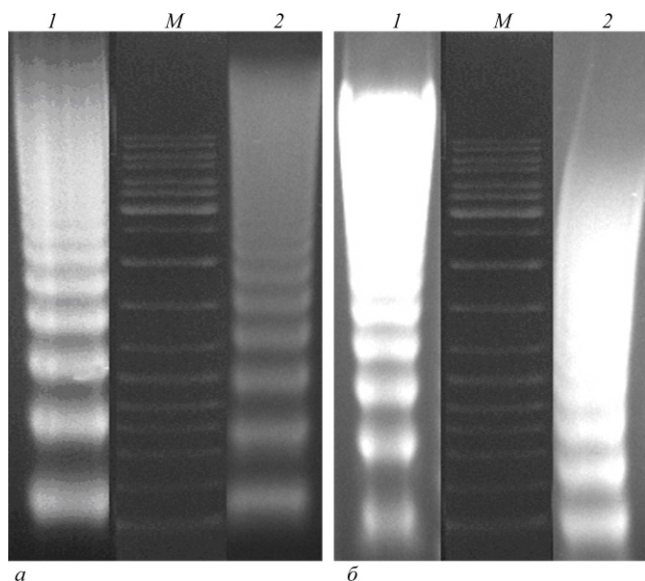


Рис. 1. Електрофореграми фрагментованої ядерної ДНК лімфоцитів (1) і клітин печінки (2): а – фрагментована ДНК опромієних шурів у початкові періоди після опромінення; б – фрагментована ДНК опромієних шурів з карциною Герена на термінальних етапах пухлинного росту; М – маркерний препарат Gene Ruler™

п. н., які відповідають петельному рівню організації хроматину, можна пов'язати з топологічними перебудовами геному та формуванням на клітинному рівні відповіді на фракціоноване рентгенівське опромінення внаслідок активації певних генів [14]. Ефекти, індуковані малими дозами іонізуючої радіації, реалізуються через перебудову структур клітинних ядер, що може обумовлюватися репараційними процесами. Опромінення в малих дозах (до 20 сГр) ініціює перебудову структури хроматину, що є необхідним етапом при підвищен-

ні активності генів, відповідальних за синтез специфічних для адаптивної відповіді клітин білків. Для такої тимчасової перебудови структури ядра потрібна ендогенна активація додаткової кількості розривів, індукція яких у даному разі є фізіологічною реакцією клітин [14, 15]. Розподіл низькомолекулярних фрагментів розмірами від 2 тис. п. н. і менше (на частку яких у лімфоцитах припадає 23 %, в ядрах печінки – до 18 %, рис. 2, а) носить дискретний характер (рис. 1, а). Водночас, використавши спектрофотометричний метод як найприйнятніший для оцінки структурних змін молекули ДНК печінки за дії низькоінтенсивних доз радіації [9], ми встановили зсув кривих спектрофотометричного титрування у бік менших співвідношень Р/Д та появу двох ізобестичних точок у даній області (рис. 3, а), що теж вказує не лише на наявність розривів у молекулі ДНК клітин печінки, а й свідчить про розплетення подвійної спіралі. При аналізі характеру пошкодження ядерної ДНК лімфоцитів методом ДНК-комет, якому притаманна найвища чутливість в індикації генотоксичних впливів на молекулу ДНК [12], виявлено зростання частки клітин, що формують комети класу С2 (рис. 4).

Відомо, що підвищення кількості комет цього класу корелює із збільшенням інтенсивності апоптозу в досліджуваних клітинах [11], де хроматин конденсується по периферії ядра або має вигляд шару чи напівмісяця, який займає більшу частину ядра. Внаслідок зростання рівня двониткових розривів серед проаналізованих ДНК-комет основна частина характеризується моментом «хвоста» в

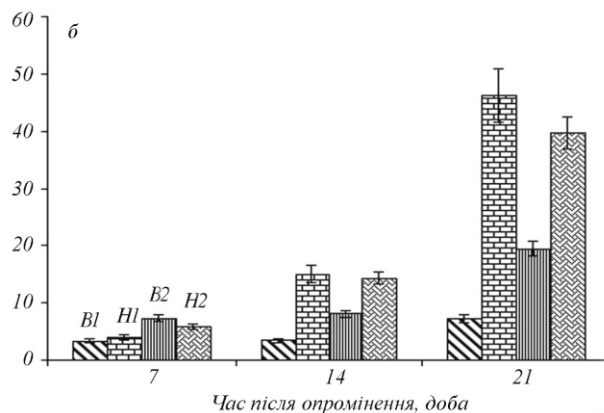
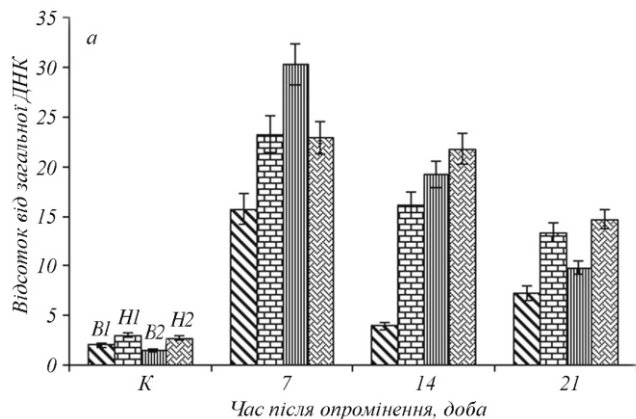


Рис. 2. Вміст високо- (В) та низько- (Н) молекулярних фрагментів ядерної ДНК клітин печінки і лімфоцитів попередньо опромієних шурів: 1 – клітини печінки; 2 – лімфоцити крові

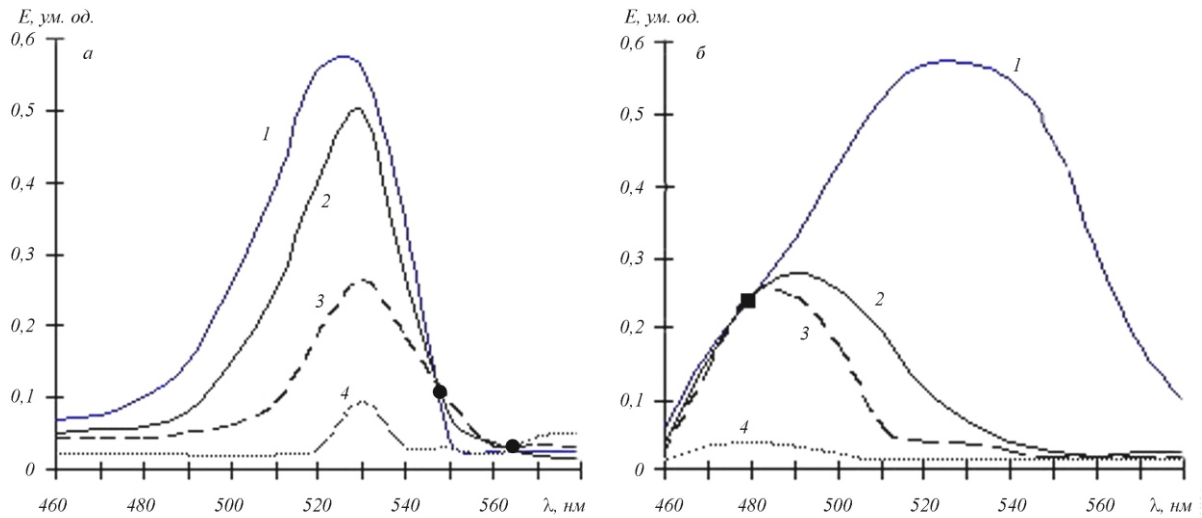


Рис. 3. Спектри поглинання сумішей піроніну G зі зразками ДНК, виділеними з печінки опроміненних щурів на початкових (а) і термінальних (б) етапах росту карциноми Герена: 1 – P/D = 0; 2 – P/D = 14,6; 3 – P/D = 1,03; 4 – P/D = 0,2

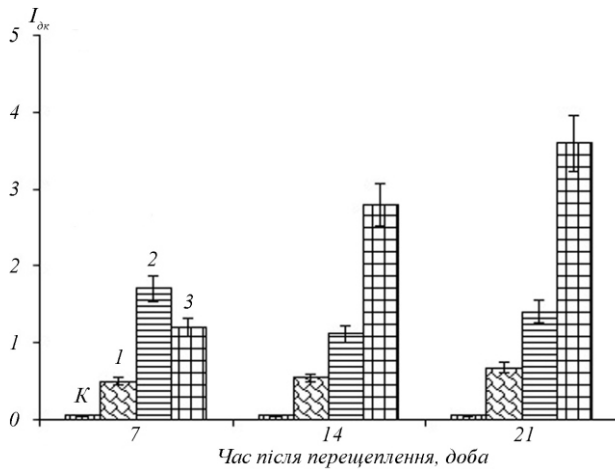


Рис. 4. Індекс ДНК-комети лімфоцитів крові пухлиноносців (1), опроміненних тварин (2), та попередньо опроміненних тварин з карциномою Герена (3) на різних етапах пухлинного росту; К – контроль

межах від 0 до 50 мкм [11, 12]. Виявляються також комети (на частку яких припадає до 20 %) з показниками моменту «хвоста» від 50 до 230 мкм, що відповідають некротичним клітинам, поява яких, імовірно, пов'язана з неповноцінною репарацією індукованих радіацією пошкоджень через зміни балансу ферментів репарації при опроміненні в малих дозах [16]. По мірі віддалення від часу опромінення динаміка досліджуваних показників наближалася до рівня контрольних.

При аналізі геномної стабільності лімфоцитів і клітин печінки в опроміненому організмі з карци-

номою Герена у цей же період експерименту в ядерній фракції не фіксували ознак значної фрагментації ДНК. У латентний період росту карциноми Герена (7-ма доба експерименту) на отриманих електрофореграмах виявляються лише низькомолекулярні фрагменти ДНК розміром близько 200 п. н. При вивченні кривих спектрофотометричного титрування встановлено переважання комплексів P/D, утворених за кооперативним (зовнішнім) типом зв'язування, у вигляді агрегованого барвника на полінуклеотидній матриці (наявність ізобестичної точки в області низьких значень P/D) і відсутність ізобестичної точки в області високих значень P/D, що характеризує зв'язування барвника з молекулою ДНК за типом інтеркаляції [9] та підтверджує відсутність деструктивних змін і цілісність молекули ДНК на даному етапі експерименту. У цей же період дослід у популяції лімфоцитів переважали клітини, які формували комети класу C0/C1 (до 90 %).

З урахуванням непараметричних критеріїв оцінки для різних класів комет визначено, що для більшості клітин (64 %) величина моменту «хвоста» комети була невеликою і коливалася в межах 10 мкм. Виявлену картину спостерігали протягом періоду активного росту пухлини, проте на термінальних етапах онкогенезу в лімфоцитах та клітинах печінки фіксували класичні зміни, характерні для індукованого радіацією апоптозу [13], які

кількісно переважали зміни в опроміненому організмі без пухлини. Зокрема, рівень низькомолекулярних фрагментів у клітинних ядрах печінки опромінених щурів з карциною Герена, який зростав у 4 рази (рис. 2, б), та зменшення величини поглинання в діапазоні низьких значень P/D (зв'язування за зовнішнім типом із меншою кількістю місць, які займає ліганд) і наявність ізобестичної точки в діапазоні високих значень P/D (зв'язування барвника з ДНК за типом інтеркаляції) у зразках цієї дослідної групи (рис. 3, б) вказують на посилену деградацію ядерної ДНК печінки. Водночас рівень СЗ-комет, які морфологічно відображають пізні етапи апоптозу, зростав у 6 разів порівняно з попереднім етапом онкогенезу та вдвічі переважав показники опромінених тварин у початковій періоді після опромінення.

Об'єктивно підвищені показник індексу ДНК-комет (рис. 4), відсоток клітин з величиною моменту «хвоста» комети до 200 мкм, а також «розмитість» електрофоретичного треку високомолекулярної фрагментованої ДНК (рис. 1, б) свідчать про посилені безладні деструктивні процеси в ядрах досліджуваних клітин та неможливість їх повноцінної репарації. Виявлені особливості деградації ядерної ДНК печінки та лімфоцитів опромінених щурів з карциною Герена засвідчують синергічне посилення генотоксичності наслідків опромінення в малих дозах за умов росту злоякісного новоутворення.

**Висновки.** Отже, на основі даних електрофоретичного та спектрофотометричного дослідження встановлено, що порушення молекулярної цілісності ядерної ДНК печінки і лімфоцитів крові на початкових етапах після дії фракціонованого опромінення організму малими дозами ( $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг щодня) має односпрямований характер, найвираженіший у лімфоцитах крові опромінених тварин, та проявляється у зростанні частки фрагментів розмірами 10–50 тис. п. н. та від 2 тис. п. н.

Високі показники моменту «хвоста» комет та індексу ДНК-комет, отримані при мікроелектрофорезі ДНК індивідуальних лімфоцитів, вказують на підвищення рівня радіаційно індукованої загибелі значної частини популяції лімфоцитів крові опромінених тварин з відновленням стабільності

їхнього геному у віддалені періоди після усунення радіаційного чинника.

Водночас індуковані радіацією пошкодження ядерної ДНК клітин печінки і лімфоцитів опроміненого організму, у якому розвивається злоякісне новоутворення, з високою часткою деструктивності спостерігаються лише на термінальних етапах росту карциноми Герена та найпомітніші в печінці опромінених пухлиноносців. Виявлена нестабільність ядерної ДНК лімфоцитів і печінки об'єктивно унеможливило їх повноцінне функціонування, що може сприяти інтенсифікації онкогенезу в опроміненому організмі, а також бути причиною підвищення генотоксичності застосовуваних хіміопрепаратів при спробах елімінації злоякісного новоутворення.

*M. M. Marchenko, G. P. Kopylchuk, I. O. Shmarakov, L. V. Blynda*

Genotoxicity estimation of tumor growth in organisms preliminary irradiated at low doses

Summary

**Aim.** To determine a level of nuclear DNA stability in the liver and blood lymphocytes of an organism with Guerin's carcinoma, developing at low doses irradiation background. **Methods.** Single cell DNA microelectrophoresis, electrophoresis of total and fragmented DNA, spectrophotometer titration of DNA complexes with pironin G. **Results.** The damage of nuclear DNA in the liver and blood lymphocytes at the initial stages after preliminary irradiation at low doses (daily dose  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Kl/kg) has mono-directional character, mostly expressed in the blood lymphocytes by increasing of 10–50 kb, 2 kb and less DNA fragments amount. At the same time, nuclear DNA damage induced by radiation in the liver and blood lymphocytes of the organism with the developing tumor manifests itself by a high rate of destructivity at the terminal stages of Guerin's carcinoma growth only, mostly revealed in the liver of irradiated rats with tumor. **Conclusions.** The observed instability of nuclear DNA in the lymphocytes and liver may reduce their adequate functioning that could promote oncogenesis in the irradiated organism, and also cause an increase of drugs genotoxicity at the efforts of malignant growth elimination.

*Key words:* nuclear DNA, liver, lymphocytes, genotoxicity.

*M. M. Марченко, Г. П. Копильчук, И. А. Шмараков, Л. В. Блында*

Оценка генотоксичности опухолевого роста в предварительно облученном малыми дозами организме

Резюме

**Цель.** Определить уровень стабильности ядерной ДНК печени и лимфоцитов крови в организме с карциномой Герена, развивающейся на фоне фракционированного рентгеновского облучения в малых дозах. **Методы.** Микроэлектрофорез ДНК

индивидуальных клеток, электрофорез тотальной и фрагментированной ядерной ДНК, спектрофотометрическое титрование комплексов ДНК с пиронином G. **Результаты.** Нарушение молекулярной целостности ядерной ДНК печени и лимфоцитов крови на начальных этапах после фракционированного облучения организма малыми дозами имеет односторонний характер, наиболее выраженный в лимфоцитах крови облученных животных, и проявляется в увеличении доли фрагментов размерами 10–50 тыс. п. н. и от 2 тыс. п. н. Индуцированные радиацией повреждения ядерной ДНК клеток печени и лимфоцитов облученного организма со злокачественным новообразованием проявляются с высокой долей деструктивности только на терминальных этапах роста карциномы Герена и наиболее выражены в печени облученных опухоленосителей. **Выводы.** Выявленная нестабильность ядерной ДНК лимфоцитов и печени объективно делает невозможным их полноценное функционирование, что может способствовать интенсификации онкогенеза в облученном организме, а также быть причиной повышения токсичности химиопрепаратов при попытках элиминации злокачественного новообразования.

Ключевые слова: ядерная ДНК, печень, лимфоциты, генотоксичность.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Okulov V. B., Zubova S. G. Adaptive reactions of the cell as the starting point of tumor progression // *Vopr. onkol.*—2000.—**46**, N 5.—P. 505–512.
- Larionova V. B., Gorozhanskaya E. G., Kolomeytshev O. A. Hepatotoxicity of medicals for cancer patients // *The Bull. Intens. Ther.*—2004.—N 3.—P. 8–15.
- Sevan'kaev A. V. Results of cytogenetic studies of the consequences of the Chernobyl accident // *Radiats. Biol. Radioecol.*—2000.—**40**, N 5.—P. 589–595.
- Mazurik V. K., Mikhailov V. F. Radiation-induced genomic instability: phenomenon, molecular mechanisms, pathogenetic significance // *Radiats. Biol. Radioecol.*—2001.—**41**, N 3.—P. 272–289.
- Premkumar K. Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice // *Hum. Exp. Toxicol.*—2006.—**25**, N 2.—P. 79–84.
- Lymphocytes: Methods* / Ed. G. Claus.—M.: Mir, 1990.—100 p.
- Marchenko M. M., Kopyl'chuk G. P., Shmarakov I. O. DNase activity and chromatin fragmentation in cell nuclei in the process of tumor growth // *Biopolymers and Cell.*—2004.—**20**, N 6.—P. 511–514.
- Freeman S. Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive dna by alkaline gel electrophoresis: application to pyrimidine dimers // *Anal. Biochem.*—1986.—**158**, N 1.—P. 119–129.
- Kruglova E. B., Krasnitskaia A. A., Maleev V. Ia. Spectrophotometric complexes of nucleic acids with pyronine G dyes as a test for radiation damage of DNA // *Mol. Biol.*—1995.—**29**, N 1.—P. 125–132 (in russian).
- Kaminskiy V. O., Lutsik M. D., Stoika R. S. Comet assay of DNA fragmentation modification of silver staining for obtaining permanent preparations // *Ukr. Biochem. J.*—2005.—**77**, N 6.—C. 105–107.
- Tronov V. A., Konoplyannikov M. A., Nikolskaya T. A., Konstantinov E. M. Apoptosis of unstimulated human lymphocytes and DNA strand breaks induced by the topoisomerase II inhibitor etoposide // *Biochemistry.*—1999.—**64**, N 3.—C. 412–420.
- Trzeciak A., Kowalik J., Malecka-Panas E., Drzewoski J., Wojewodzka M., Iwanenko T., Blasiak J. Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (comet assay) // *Med. Sci. Monit.*—2000.—**6**, N 1.—P. 24–29.
- Willingham M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis // *J. Histochem. Cytochem.*—1999.—**47**.—P. 1101–1109.
- Spitkovskiy D. M., Ermakov A. V., Gorin A. I., Pospekhova N. I., Sorokinna T. A., Talyzina T. A. The characteristics of unscheduled DNA synthesis and of the changes in the structural parameters of human lymphocyte nuclei after the action of X-ray radiation in low doses and in combination with UV irradiation // *Radiats. Biol. Radioecol.*—1994.—**34**, N 1.—P. 23–31.
- Suskov I. I., Kuz'mina N. S. The problem of induced genomic instability in the child body cells under conditions of long-term effect of small radiation doses // *Radiats. Biol. Radioecol.*—2001.—**41**, N 5.—P. 606–614.
- Short S., Bourne S., Martindale C., Woodcock M., Jackson S. DNA damage responses at low radiation doses // *Radiat. Res.*—2005.—**164**, N 3.—P. 292–302.

УДК 612.014.48

Надійшла до редакції 30.05.08