

УДК 591.147.1.044:539.16.04

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ОНТОГЕНЕЗА НА ЧАСТОТУ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МИКРОЯДЕР В КЛЕТКАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2013 О.В. Раскоша, О.В. Ермакова, Н.Н. Старобор

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, г. Сыктывкар

Поступила в редакцию 15.05.2013

С помощью микроядерного теста проанализировано состояние клеток щитовидной железы у животных из природных популяций и у лабораторных мышей линии СВА, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации в малой дозе в разные периоды онтогенеза. Обнаружено усиление формирования клеточек с микроядрами в щитовидной железе полевок-экономок, обитающих на радиоактивном участке по сравнению с животными с контрольного участка. В эксперименте на мышах, развивающихся в условиях хронического воздействия низкоинтенсивного γ -излучения (8 сГр) в период раннего онтогенеза также происходило увеличение числа фолликулярных тироцитов с микроядрами. Хроническое облучение взрослых мышей в такой же суммарной поглощенной дозе, как и в предыдущем варианте эксперимента, не вызывало генотоксического эффекта в клетках щитовидной железы.

Ключевые слова: *полевки-экономки, мыши линии СВА, микроядерный тест, тироциты, хроническое γ -излучение, малые дозы, онтогенез*

В раннем онтогенезе организм особенно чувствителен к влиянию неблагоприятных факторов среды, и даже относительно слабые воздействия, не вызывающие видимых морфологических повреждений, нередко сопровождаются длительными, а порой и постоянными нарушениями эндокринной регуляции физиологических функций. Особенно это относится к долгосрочным пренатальным стрессовым воздействиям, последствия которых приводят к возникновению необратимых патологических изменений у взрослого организма [1, 2]. Особое место в период онтогенеза принадлежит щитовидной железе (ЩЖ), которая регулирует обменные процессы в организме, играет одну из ведущих ролей в процессах адаптации, поэтому выявление цитогенетических нарушений в клетках ЩЖ является важной задачей при оценке генетических эффектов у облученных животных. Информативным и быстрым способом индикации цитогенетических повреждений является микроядерный тест, который основан на подсчете количества

интерфазных клеток с добавочными ядерными тельцами-микроядрами [3-5]. Наиболее часто для этих целей используются непрерывно размножающиеся популяции клеток, например, эритроидные клетки костного мозга [6, 7]. В последнее время показано, что микроядерный тест на фолликулярных тироцитах по чувствительности сопоставим с таковым на эритроидных клетках костного мозга, однако по сравнению с последним позволяет регистрировать действие вещества в более широком диапазоне доз [8]. В серии экспериментов на модели предварительно стимулированных к размножению фолликулярных тироцитов (гемитироидэктомия) в опытах *in vivo* на крысах линии Вистар было показано, что микроядерный тест является чувствительным методом оценки интенсивности влияния генотоксичных агентов (метилнитрозомочевина) на тироидную паренхиму щитовидной железы [9]. На крысах линии Вистар были получены результаты, свидетельствующие о высокой информативности микроядерного теста при исследовании воздействия низкоинтенсивного γ -излучения на процессы формирования фолликулярных тироцитов с микроядрами в ЩЖ [10].

Цель работы: с помощью микроядерного теста проанализировать состояние клеток ЩЖ животных из природных популяций и лабораторных мышей, подвергнутых воздействию хронического низкоинтенсивного ионизирующего излучения в разные периоды онтогенеза.

Раскоша Оксана Вениаминовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела радиоэкологии. E-mail: raskosha@ib.komisc.ru

Ермакова Ольга Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела радиоэкологии. E-mail: ermakova@ib.komisc.ru

Старобор Наталья Николаевна, старший лаборант-исследователь отдела радиоэкологии. E-mail: starobor@ib.komisc.ru

Материал и методы исследования. Исследование проводили на половозрелых полевках-экономках, привезенных с участков с нормальным и повышенным содержанием естественных радионуклидов (зона средней тайги, Ухтинский район Республики Коми). Радиевый участок образовался в результате интенсивного освоения в 1940-е годы подземных вод, богатых по содержанию ^{226}Ra . В условиях загрязнения данной территории популяция полевкок-экономок обитает уже более 60-ти лет. Средняя мощность дозы внешнего γ -излучения на радиевом участке составляла 50-2000 мкР/ч, на контрольном – 10-15 мкР/ч. Суммарная поглощенная доза облучения для группы животных изменялась от 1,2 до 24,0 сЗв/год [11]. После отлова полевки с обоих участков были доставлены в виварий Института биологии, где их содержали в идентичных условиях в течение трех месяцев до момента декапитации.

Экспериментальные исследования были проведены на половозрелых мышах линии СВА, которые были разделены на две группы. В целях изучения цитогенетического состояния клеток ЩЖ после радиационного воздействия в ранние периоды онтогенеза из животных I экспериментальной группы были сформированы семьи (самец + 1-2 самки), которых содержали в условиях повышенного радиационного фона (мощность дозы – 4000 мкР/ч). Полученное от этих животных потомство (первое поколение) находилось под воздействием γ -излучения с момента зачатия и до достижения ими двух месячного возраста после рождения (общая продолжительность облучения, включая пренатальный период, составила 79 сут), поглощенная доза – 8 ± 2 сГр. Животных II группы подвергали хроническому внешнему облучению в течение 10 сут. (мощность дозы – 40000 мкР/ч), суммарная поглощенная доза, также как и в предыдущем варианте эксперимента составила 8 ± 2 сГр. Всех мышей декапитировали сразу после прекращения облучения. В эксперименте источником γ -излучения были две ампулы со стальной оболочкой, содержащие $0,474 \times 10^6$ и $0,451 \times 10^6$ кБк ^{226}Ra , разнесенные друг от друга на расстояние 2,5 м (Лицензия СЕ-03-205-2005). Мощность дозы измеряли радиометром ДРГЗ (Свидетельство о поверке № 099325). Суммарную поглощенную дозу определяли при помощи индивидуальных дозиметров типа DTU-1 с детекторами ДТГ-4 при помощи дозиметрической термолюминесцентной установки ДВГ-02ТМ. Каждой экспериментальной группе соответствовал свой контроль. Контрольные особи были одного возраста с экспериментальными, их содержали в виварии в условиях нормального радиационного фона и подвергали декапитации одновременно с облученными животными.

Для проведения микроядерного теста ЩЖ подвергали ферментативной обработке с помощью коллагеназы (Collagenase type IA, 2,5 мг/мл, $t=37^\circ\text{C}$) в течение 30 мин. Для отмывания тироцитов от коллагеназы добавляли 500 мкл холодного фосфатно-солевого буфера [12]. Отмытую суспензию клеток обрабатывали в течение 20 минут 0,56% гипотоническим раствором хлорида калия ($t=37^\circ\text{C}$, 20 мин), фиксировали метанол-уксусной кислотой и раскапывали на обезжиренные предметные стекла, которые сушили на воздухе. Готовые препараты изолированных тироцитов окрашивали акрединовым оранжевым и анализировали под люминесцентным микроскопом «Infinity» с системой захвата и обработки изображений при ув. ок. 10 х об. 100. От каждого животного подсчитывали по 1000 тироцитов, в которых оценивали частоту встречаемости клеток с микроядрами. Всего было приготовлено препаратов от 69 животных.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показали, что у полевкок-экономок, привезенных с радиевого участка происходит повышение ($p \leq 0,05$) количества микроядер в ЩЖ в 2,7 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Высокая индукция абберантных клеток спустя длительное время после облучения, вероятно, связана с тем, что животные из природных популяций получали кроме внешнего облучения инкорпорированные радионуклиды с пищей, водой и при дыхании, а также находились под воздействием облучения в течение всего пренатального и раннего постнатального онтогенеза.

В проведенном нами эксперименте на линейных мышах, развивающихся в период пренатального и раннего постнатального онтогенеза в условиях хронического низкоинтенсивного γ -излучения, также зарегистрировано достоверное повышение количества микроядер в тироцитах по сравнению с контрольными особями (у самцов в 1,4 раза, у самок в 1,5 раза). У некоторых животных были отмечены клетки с двумя микроядрами (рис. 2). Повышенная индукция цитогенетических повреждений в ЩЖ животных этой экспериментальной группы, очевидно, связана с тем, что особи подвергались воздействию радиации с самых ранних стадий онтогенеза, когда происходит закладка и формирование тканей, органов и систем, в период, когда организм особенно чувствителен к влиянию неблагоприятных факторов среды. Из литературы известно, что воздействие низкоинтенсивного γ -излучения в раннем онтогенезе (в течение 39 сут.) на мышей линии СВА в дозе 4 сГр вызывало долговременные изменения некоторых морфометрических показателей коры надпочечников [2]. Отсроченные эффекты, в числе которых увеличение

количества повреждений ДНК лейкоцитов крови самцов, повышение смертности и снижение массы тела были выявлены при хроническом воздействии γ -излучения в дозе 8 сГр на ранних этапах онтогенеза мышей [13].

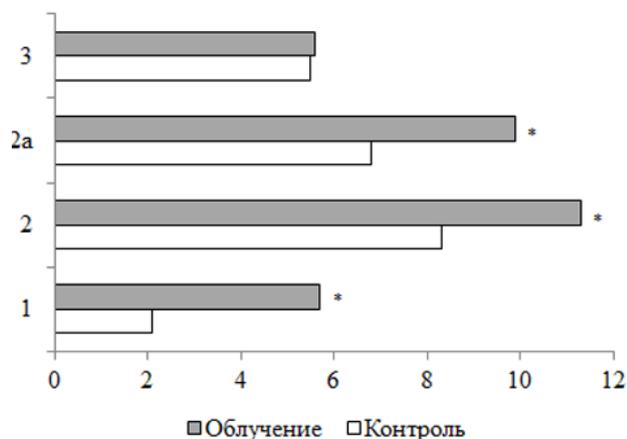


Рис. 1. Частота образования тироцитов с микроядрами (%) у животных после хронического низкоинтенсивного γ -излучения в разные периоды онтогенеза.

По оси ординат: 1 – полевки-экономки; 2, 2а и 3 – мыши линии СВА; 2 – облучение животных в ранние периоды онтогенеза (I эксперимент); 3 – облучение взрослых животных (II эксперимент). 1, 2, 3 – самцы, 2а – самки. * - различия достоверны по отношению к контролю при $p \leq 0,05$.

Анализ количества микроядер у половозрелых мышей, которых также, как и животных первой экспериментальной группы, облучали в дозе 8 сГр, не показал достоверных различий в числе микронуклеированных тироцитов по сравнению с контрольными значениями. Вероятно это связано с тем, что развитие органов и тканей у этой группы животных осуществлялось в условиях нормального радиационного фона и облучению подвергались уже половозрелые особи.



а)



б)

Рис. 2. Тироциты с одним (а) и двумя (б) микроядрами у мышей линии СВА после радиационного воздействия в ранние периоды онтогенеза (8 сГр)

Выводы:

1. Эффективность хронического воздействия низкоинтенсивного γ -излучения на фолликулярный эпителий ЩЖ полевок-экономок, обитающих на участке с повышенным уровнем радиоактивного загрязнения, проявлялась в усилении формирования клеток с микроядрами по сравнению с животными с контрольного участка.

2. У мышей линии СВА, развивающихся в период раннего онтогенеза в условиях воздействия хронического низкоинтенсивного γ -излучения (8 сГр), происходит усиление формирования клеток с микроядрами.

3. У половозрелых мышей после хронического облучения в такой же суммарной поглощенной дозе, как и в предыдущем варианте эксперимента, каких-либо изменений в частоте образования микроядер в клетках ЩЖ не обнаружено.

Работа поддержана грантом РФФИ в рамках научного проекта № 13-04-01750а и проекта Президиума РАН «Молекулярно-клеточная биология» № П12-П-4-1021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Отеллин, В.А.* Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты / В.А. Отеллин, Л.И. Хожай, Н.Э. Ордян. - СПб.: Изд-во «Десятка», 2007. 240 с.
2. *Быховец, Н.М.* Влияние низкоинтенсивного γ -излучения в ранние периоды онтогенеза на структурно-функциональное состояние коры надпочечников рыжей полевки и лабораторных мышей линии СВА. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Сыктывкар, 2009. 18 с.
3. *Schmid, W.* The micronucleus test // *Mutat. Res.* 1975. V. 31. № 1. P. 9-15.

4. Ильинских, Н.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов / Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, В.Н. Некрасов // Цитология и генетика. 1988. Т. 22. № 1. С. 67-72.
5. Heddle, J.A. A rapid in vivo test chromosomal damage // *Mutat. Res.* 1973. V. 18. № 2. P. 187-190.
6. Дурнев, А.Д. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий / А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин. – М.: Медицина, 1998. 238 с.
7. Маленченко, А.Ф. Биологические последствия комплексного воздействия радиэкологических факторов зоны отчуждения ЧАЭС и канцерогена / А.Ф. Маленченко, С.Н. Сушко, А.О. Савин и др. // Радиация и Чернобыль: Ближайшие и отдаленные последствия (Радиация и Чернобыль). 2007. Т. 4. С. 136-141.
8. Гансбургский, М.А. Анализ клеток с микроядрами в оценке пролиферации эпителия щитовидной железы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ярославль, 2005. 28 с.
9. Павлов, А.В. Получение изолированных клеток для цитологических и цитогенетических исследований эпителия щитовидной железы / А.В. Павлов, М.Б. Шапкина, М.А. Гансбургский и др. // Морфология. 2006. Т. 130. № 6. С. 81-83.
10. Ермакова, О.В. Цитогенетические эффекты в фолликулярном эпителии щитовидной железы крыс при длительном воздействии γ -излучения в малых дозах / О.В. Ермакова, А.В. Павлов, Т.В. Кораблева // Радиационная биология. Радиоэкол. 2008. Т. 48. № 2. С. 160-166.
11. Тестов, Б.В. Накопление естественных радионуклидов в организме животных на участках с повышенной радиоактивностью / Б.В. Тестов, А.И. Таскаев // Техногенные элементы и животный организм (полевые наблюдения и эксперимент). – Свердловск, УНЦ АН СССР, 1986. С. 23-36.
12. Ермакова, О.В. Индикация генотоксических повреждений с помощью цитогенетических и молекулярных методов анализа / О.В. Ермакова, Д.В. Гурьев, Л.А. Башлыкова и др. // Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды: мат-лы междунар. конф. Бирад-2009. – Сыктывкар, 2009. С. 47-50.
13. Велегжанинов, И.О. Возрастная динамика уровня повреждения ДНК, апоптоза и клеточного старения у мышей, облученных малыми дозами ионизирующей радиации на ранних стадиях развития / И.О. Велегжанинов, А.А. Москалев // Успехи геронтологии. 2008. Т. 21. № 3. С. 480-484.

EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO RADIATION IN DIFFERENT PERIODS OF ONTOGENESIS ON THE OCCURRENCE OF MICRONUCLEI IN THYROID CELLS

© 2013 O.V. Raskosha, O.V. Ermakova, N.N. Starobor

Institute of Biology Komi Scientific Centre UrB RAS, Syktyvkar

With the micronucleus test analyzes cells of the thyroid gland (TG) in animals from natural populations and laboratory CBA mice exposed to ionizing radiation in low doses in different periods of ontogeny. It has been found increased formation of cells with micronuclei in thyroid vole-housekeeper living on radioactive sites compared with animals from the control plot. In the experiment on mice that develop the chronic effects of low-intensity γ -radiation (8 cGy) during early ontogeny also is an increase in the number of follicular thyrocytes with micronuclei. Chronic exposure of adult mice of the same total absorbed dose as in the previous embodiment, the experiment did not cause genotoxic effect in cells of the thyroid gland.

Key words: tundra voles, CBA mouse, micronucleus test, thyroid cells, chronic γ -radiation, low doses, ontogenesis

Oksana Raskosha, Candidate of Biology, Research Fellow at the Radioecology Department. E-mail: raskosha@ib.komisc.ru
Olga Ermakova, Doctor of Biology, Leading Research Fellow at the Radioecology Department. E-mail: ermakova@ib.komisc.ru
Nataliya Starobor, Senior Laboratorian-Researcher at the Radioecology Department. E-mail: starobor@ib.komisc.ru