

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИЕТЫ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ПЛОТНОИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЫШЕЙ *in vivo*

© 2016 г. С.С. Сорокина, С.И. Заичкина, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова,
С.П. Романченко, А.Е. Шемяков, О.А. Вахрушева, В.Е. Балакин*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: sv0723@yandex.ru

**Физико-технический центр Физического институт им. П.Н. Лебедева РАН,
142280, Протвино Московской области, Академический проезд, 2/110*

E-mail: balakin@vlepp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 07.10.15 г.

Изучено сочетанное влияние диеты и низкоинтенсивного плотноионизирующего излучения на радиочувствительность, индукцию адаптивного ответа и рост асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии SHK. Животных облучали в дозе 0,11 Гр (0,005 Гр/сут) за верхней бетонной защитой ускорителя заряженных частиц с энергией 70 ГэВ (Протвино, Московская область). Четыре группы мышей кормили выбранными продуктами (соевое мясо, гречневая крупа, листья салата и аптечный препарат рыбьего жира) во время всего периода облучения (22 сут). В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что диета, содержащая соевое мясо, гречневую крупу или листья салата, в отличие от рыбьего жира, уменьшает чувствительность мышей к рентгеновскому излучению в дозе 1,5 Гр и вызывает достоверное торможение роста асцитной карциномы Эрлиха. Сочетанное действие плотноионизирующего излучения и данных добавок (кроме рыбьего жира) также уменьшает радиочувствительность мышей, индуцирует адаптивный ответ и вызывает торможение роста асцитной карциномы Эрлиха в отличие от мышей, облученных только плотноионизирующим излучением.

Ключевые слова: низкоинтенсивное плотноионизирующее излучение, диетические добавки, адаптивный ответ, асцитная карцинома Эрлиха, микроядра, мыши.

В последние десятилетия одной из главных проблем радиобиологии является изучение защитных механизмов от радиации с помощью различных веществ или активации внутренних ресурсов организма, к которым можно отнести такие феномены, как гормезис и адаптивный ответ, представляющие собой реакцию клетки или организма на малые повреждающие воздействия и определяющие их последующую устойчивость к высоким дозам агентов.

В исследованиях на культурах клеток с использованием плотноионизирующих излучений в различных дозах показано, что многие соединения и способы защиты, эффективные при действии рентгеновского излучения, оказались неэффективными против протонов, нейтронов и ускоренных тяжелых ионов [1]. Нами при

проведении экспериментов на Серпуховском ускорителе (Протвино, Московская область) было показано, что длительное облучение мышей в диапазоне доз 0,11–0,31 Гр низкоинтенсивного плотноионизирующего излучения (НПИ) приводит к увеличению числа клеток с микроядрами, а при последующем облучении большой дозой не индуцирует адаптивный ответ, в отличие от таких же доз хронического гамма-излучения [2]. В связи с перспективой массовых космических полетов, строительством новых мощных ускорителей заряженных частиц, широким использованием протонов и тяжелых ионов в медицине растет интерес к защитным средствам различного происхождения и особенно поиску специальных диет, поскольку природные биологически активные вещества обладают низкой токсичностью и способны эффективно повышать естественную защиту организма. Кроме того, практически отсутствуют даже медикаментозные средства, способные снизить эффект поражения при пролонгированном (в

Сокращения: НПИ – низкоинтенсивное плотноионизирующее излучение, АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, ПХЭ – полихроматофильные эритроциты.

течение нескольких часов или дней) воздействию с малой мощностью дозы [3]. Как отмечают авторы, «абсолютное большинство веществ, часто позиционируемых как средства защиты от пролонгированного низкоэнергетического излучения, относится к довольно разнородной по характеристикам противолучевых средств группе под разными названиями – стимуляторы радиорезистентности, противолучевые препараты пролонгированного действия, радиомодификаторы длительного действия ...». Исследования действия хронического НПИ и диеты на животных практически отсутствуют. До сих пор не выяснено, могут ли диетические добавки ослабить повреждающее действие низкоинтенсивного излучения на цитогенетический аппарат и снизить отдаленные эффекты радиации. Кроме того, существует проблема выбора тест-систем по показателям клеточного и организменного ответа, которые ясно укажут на защитное действие исследуемых веществ в отношении именно низкоинтенсивного излучения.

Целью работы было изучение комбинированного действия диеты и низкоинтенсивного высокоионизирующего излучения на радиочувствительность, индукцию адаптивного ответа и рост асцитной карциномы Эрлиха на мышах *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на двухмесячных самцах белых беспородных мышей линии SHK массой (26–32 г). Животных содержали в клетках по 10 мышей при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному корму. Эксперименты проводили согласно рекомендациям Комиссии по биомедицинской этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Животных облучали НПИ в дозе 0,11 Гр при средней мощности дозы 0,005 Гр/сут за верхней бетонной защитой ускорителя заряженных частиц с энергией 70 ГэВ (Протвино, Московская область). Облучение рентгеновским излучением осуществляли на установке РУТ (Мосрентген, Россия, 0,1 Гр/мин, 200 кВ, 8 мА; Пушино, Московская область).

Прежде всего, на основании анализа литературных данных и предыдущих работ лаборатории [4,5] был произведен отбор диетических добавок и тест-показателей. В состав диеты были включены продукты, содержащие большое количество биологически активных веществ: соевое мясо, гречневая крупа, листья салата и аптечный препарат рыбьего жира. Экспериментальным группам мышей к стан-

дартному гранулированному комбикорму (ООО «Лабораторкорм», Москва) добавляли исследуемые продукты во время всего периода облучения НПИ (22 сут). Отношение количества добавки продукта к стандартному корму было подобрано нами в предварительных экспериментах и составляло около 40% от общего веса дневного рациона мыши. Аптечный препарат рыбьего жира применяли в профилактических дозах, рекомендованных для человека, с учетом коэффициента пересчета концентрации с человека на мышь. Критерием при определении уровня цитогенетического повреждения служил процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами в костном мозге. На каждую экспериментальную точку использовали не менее пяти мышей и анализировали 2000–3000 ПХЭ с каждого препарата. Солидную опухоль формировали путем внутримышечной трансплантации асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в количестве 2 млн клеток в заднюю лапу мыши. Объем опухоли измеряли один раз в неделю в течение одного месяца. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 15 мышей. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вначале нами было изучено влияние диеты на уровень естественного радиационного фона и радиочувствительность мышей при облучении их рентгеновским излучением в дозе 1,5 Гр или по схеме радиационного адаптивного ответа (0,1 Гр + 1,5 Гр). Как видно из табл. 1, включение в рацион диетических добавок не вызвало изменения уровня естественного радиационного фона. Включение в рацион соевого мяса, гречневой крупы и листьев салата вызывало достоверное уменьшение количества ПХЭ с микроядрами после облучения в дозе 1,5 Гр, в отличие от добавления рыбьего жира. При облучении мышей, содержащихся на диете, по схеме адаптивного ответа (0,1 Гр + 1,5 Гр), не было отмечено дополнительного снижения уровня цитогенетических повреждений по сравнению с группой, облученной по этой же схеме и содержащейся на стандартном корме.

Далее нами было изучено комбинированное действие НПИ в дозе 0,11 Гр и диеты на уровень ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышей при последующем облучении их в дозе 1,5 Гр и по схеме радиационного адаптивного ответа (табл. 2). Важно заметить, что при облучении мышей НПИ в дозе 0,11 Гр, получавших все варианты добавок к питанию, наблю-

Таблица 1. Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей в присутствии добавок к питанию и последующем облучении их в дозе 1,5 Гр рентгеновского излучения и по схеме радиационного адаптивного ответа (0,1 Гр + 1,5 Гр)

Вариант пищевой добавки	Схема облучения	Число мышей	Число анализированных ПХЭ	Число ПХЭ с микроядрами	ПХЭ с микроядрами, %
Стандартный корм	Без облучения	30	75000	291	0,39 ± 0,07
Соевое мясо		20	50000	170	0,34 ± 0,07
Гречневая крупа		11	15000	59	0,39 ± 0,02
Листья салата		10	30000	153	0,51 ± 0,17
Рыбий жир		5	10000	38	0,38 ± 0,05
Соевое мясо	1,5 Гр	5	15000	996	6,64 ± 0,80*
Гречневая крупа		5	15000	795	5,30 ± 1,00*
Листья салата		5	15000	1139	7,59 ± 0,68
Рыбий жир		5	15000		8,63 ± 0,63
Стандартный корм		5	14000	1267	9,05 ± 1,21
Соевое мясо	0,1 Гр + 1,5 Гр	5	15000	757	5,05 ± 0,53
Гречневая крупа		5	15000	860	5,73 ± 0,63
Листья салата		5	15000	779	5,19 ± 1,43
Рыбий жир		5	15000	981	6,54 ± 0,60
Стандартный корм		5	15000	819	5,46 ± 0,57

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем 1,5 Гр.

Таблица 2. Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей, облученных плотниоизирующим излучением в дозе 0,11 Гр в присутствии добавок к питанию и последующем облучении их в дозе 1,5 Гр рентгеновского излучения и по схеме радиационного адаптивного ответа

Вариант пищевой добавки	Схема облучения	Число мышей	Число анализированных ПХЭ	Число ПХЭ с микроядрами	ПХЭ с микроядрами, %
Стандартный корм	0,11 Гр НПИ	5	18 000	116	0,64 ± 0,08*
Соевое мясо		5	10000	30	0,30 ± 0,11
Гречневая крупа		5	10000	42	0,42 ± 0,10
Листья салата		5	10000	34	0,34 ± 0,16
Рыбий жир		5	30000	80	0,27 ± 0,06
Необлученные животные		5	10000	40	0,40 ± 0,10
Соевое мясо	0,11 Гр НПИ + 1,5 Гр Х-лучей	5	15000	696	4,64 ± 0,65**
Гречневая крупа		5	19000	828	4,36 ± 0,67**
Листья салата		5	11000	530	4,82 ± 1,01**
Рыбий жир		5	15000	1294	8,10 ± 0,71
Стандартный корм		5	40000	2519	7,90 ± 0,60
Соевое мясо	0,11 Гр НПИ + 0,1 Гр + 1,5 Гр Х-лучей	5	20000	726	3,63 ± 0,50*
Гречневая крупа		5	20000	1050	5,25 ± 0,80*
Листья салата		5	20000	1102	5,51 ± 0,55*
Рыбий жир		5	15000	1127	7,51 ± 0,53
Стандартный корм		5	33000	1784	7,45 ± 0,57

Примечание: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ по сравнению с контролем в своей группе.

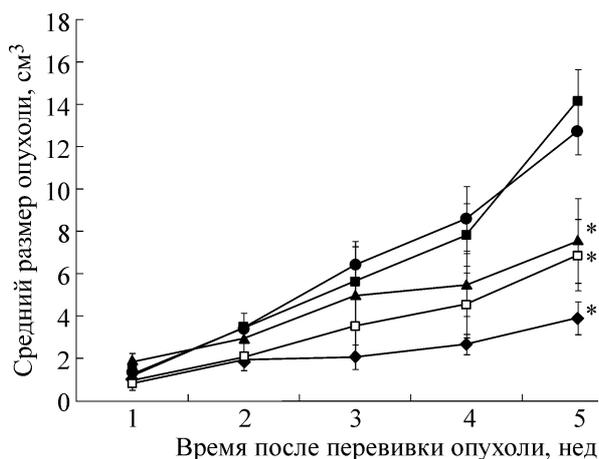


Рис. 1. Динамика роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей в отсутствие (кружки) и в присутствии соевого мяса (ромбы), гречневой крупы (светлые квадраты), листьев салата (треугольники) и рыбьего жира (темные квадраты), * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

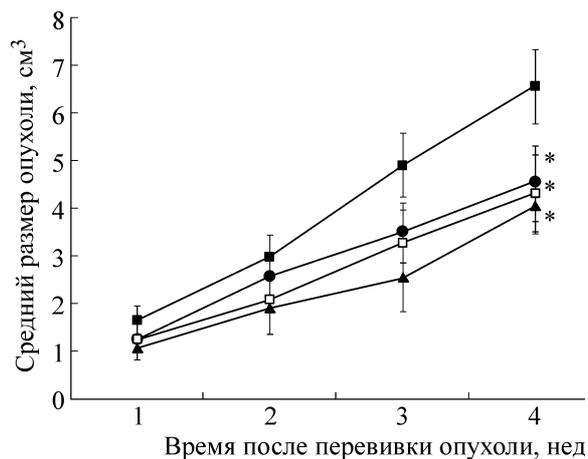


Рис. 2. Динамика роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей, облученных в дозе 0,11 Гр НПИ в отсутствие (темные квадраты) и в присутствии соевого мяса (кружки), гречневой крупы (светлые квадраты) и листьев салата (треугольники), * $p \leq 0.05$ по сравнению с группой мышей 0,11 Гр НПИ.

дается достоверное уменьшение количества ПХЭ с микроядрами до уровня естественного радиационного фона. При последующем облучении мышей в дозе 1,5 Гр рентгеновского излучения выявлено, что в группах мышей, получавших соевое мясо, гречневую крупу и листья салата, значительно снижался уровень цитогенетических повреждений, т.е. также наблюдался защитный эффект. Добавление к стандартному корму рыбьего жира не оказало влияния на количество повреждений, которое было таким же, как в группе животных, облученных 0,11 Гр НПИ + 1,5 Гр X-лучей. Из результатов, представленных в табл. 2, также видно, что диетические добавки, кроме рыбьего жира, в сочетании с НПИ при дополнительном облучении мышей по схеме радиационного адаптивного ответа также приводили к снижению повреждений в костном мозге по сравнению с группой мышей, облученных по этой же схеме на стандартном корме. Величины полученных адаптивных ответов при облучении животных НПИ на фоне диеты не отличались от величины радиационного адаптивного ответа (0,1 Гр + 1,5 Гр).

Следующим этапом работы было исследование действия выбранного режима диеты (22 сут) на рост асцитной карциномы Эрлиха у необлученных мышей (рис. 1). Видно, что все добавки к питанию, за исключением рыбьего жира, вызывали торможение роста АКЭ у необлученных мышей.

На рис. 2 представлена динамика роста солидной формы АКЭ у мышей при сочетанном

действии НПИ в дозе 0,11 Гр в присутствии добавок к питанию. Видно, что диета, включающая в себя соевое мясо, гречневую крупу и листья салата, также приводила к уменьшению размера опухоли по сравнению с группой мышей, облученных НПИ и содержащихся на стандартном корме.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние десятилетия интерес к использованию диетических добавок как средства защиты от неблагоприятных факторов труда и жизни стремительно возрастает. Основное внимание уделяется исследованию различных растений, которые являются естественными источниками витаминов, микроэлементов, флавоноидов [6]. В многочисленных работах изучалось влияние включения в рацион животных различных ягод, овощей, зерновых культур, лекарственных растений до или после облучения ионизирующими излучениями в основном в летальных и сублетальных дозах при однократном облучении. Показано благотворное влияние такого рациона на клеточные показатели крови, повышение выживаемости и выносливости к динамической нагрузке, что связывают с активацией репаративных процессов в клетках и антиоксидантными свойствами препаратов [7]. Следует отметить, что наблюдаемые противолучевые эффекты добавок значительно зависят от продолжительности и схемы введения, весового количества и соотношения разных компонентов диеты. В литературе уже накоп-

ливаются данные, что те соединения, которые обладают защитным действием при облучении животных гамма-радиацией, часто не эффективны при действии плотноионизирующих излучений. Так, в экспериментах на мышах линии СВА применение сложной пищевой добавки, содержащей селенметионин, коэнзим Q10, ацетилцистеин, альфа-липоевую кислоту, витамин E и др., частично или полностью предотвращало снижение общего антиоксидантного статуса после острого плотноионизирующего облучения в дозе 0,5 Гр ^{56}Fe или 3 Гр протонов. Некоторые комбинации антиоксидантов с коэнзимом Q10 или без него защищали и от гамма-радиации [8].

Увеличение длительности космических полетов и планы освоения дальнего космоса инициировали работы по поиску веществ, защищающих организм от хронического плотноионизирующего излучения. Ряд работ по этой теме выполнен с использованием тяжелых частиц ^{56}Fe в качестве наземного моделирования космических лучей. Авторами исследовалось действие экстрактов ягод на нейрохимические и поведенческие изменения облученных крыс, а также на частоту возникновения опухолей и продолжительность жизни [9,10]. В нашей работе для моделирования условий космических полетов было использовано сложное низкоинтенсивное плотноионизирующее нейтрон-протонное излучение за верхней бетонной защитой ускорителя, спектр которого похож на спектр радиационного поля, формируемого космическими лучами в атмосфере на высоте от 3 до 12 км [2]. Как показано в наших ранних экспериментах, хроническое облучение мышей НПИ в диапазоне доз 0,11–0,31 Гр приводило к увеличению числа клеток с микроядрами в костном мозге и не индуцировало адаптивный ответ, в отличие от аналогичных доз хронического гамма-излучения при той же мощности, хотя начальный уровень повреждений ДНК и хромосом у них одинаковый. Эти результаты можно объяснить структурой возникающих нарушений в ДНК, изменением в экспрессии специфических генов, участвующих в репарации ДНК и работе антиоксидантных систем, что приводит к более неблагоприятным отдаленным последствиям [11].

Существенным отличием нашей работы от известных исследований также являлось то, что мыши получали диетические добавки во время всего сеанса облучения. При облучении НПИ в дозе 0,11 Гр у мышей, получавших добавки к питанию, наблюдалось достоверное уменьшение количества ПХЭ с микроядрами до уровня естественного радиационного фона по сравне-

нию с мышами, получавшими только стандартный корм. Сочетанное действие НПИ и данной диеты, кроме рыбьего жира, уменьшало чувствительность мышей к последующему облучению в дозе 1,5 Гр, в отличие от мышей, облученных только дозой НПИ, т.е. появлялась способность к индукции адаптивного ответа. Облучение всех экспериментальных групп мышей по схеме радиационного адаптивного ответа, т.е. 0,1 Гр + 1,5 Гр рентгеновского излучения, не выявило дополнительного изменения уровня цитогенетических повреждений. Таким образом, впервые нами было выявлено антимуtagenное действие диетических добавок как при хроническом облучении мышей в низкой дозе НПИ, так и при средней дозе редкоионизирующего излучения.

Ранее нами было показано, что облучение мышей низкими дозами НПИ приводит к ускорению роста опухолей [5], поэтому было интересно исследовать влияние добавок, которые снижали цитогенетические повреждения, на скорость роста опухолей. В результате было обнаружено, что диеты, содержащие соевое мясо, гречневую крупу или листья салата, вызывают достоверное торможение роста АКЭ у мышей, облученных за бетонной защитой ускорителя. Известно, что как натуральная соя, так и отдельные выделенные из нее компоненты обладают выраженными противоопухолевыми, противовоспалительными и радиозащитными свойствами. Большое количество эпидемиологических исследований показало, что диеты, содержащие соевые продукты, снижают частоту возникновения и смертности от рака груди, прямой кишки и простаты [12,13]. Обнаружено несколько механизмов этих эффектов: ингибирование продукции разных видов свободных радикалов в клетке, активация генов репарации, антиоксидантной системы, апоптоза и др. [14]. В нашей работе было показано, что добавление к рациону мышей выбранных добавок, обладающих, как и соя, известной антиоксидантной активностью, также нивелирует негативный эффект НПИ, проявляющийся в ускоренном росте АКЭ.

ВЫВОДЫ

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют об антимуtagenном и антиканцерогенном действии изученных диетических добавок при облучении мышей низкой дозой НПИ и могут быть полезны для разработки профилактических противолучевых диет.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных

исследований в рамках научного проекта № 14-04-32222 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. Guangming, K. Tetsuya, F. Yoshiya, et al., *Radiat. Res.* **47**, 175 (2006).
2. С. И. Заичкина, О. М. Розанова, А. Х. Ахмадиева и др., *Авиакосмическая и экологическая медицина* **41** (6), 360 (2007).
3. Л. М. Рождественский, В. Ф. Михайлов, Т. Г. Шлякова и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **55** (4), 420 (2015).
4. Н. В. Кондакова, С. И. Заичкина, О. М. Розанова и др., *Вопр. биол., мед. фармацевт. химии* **4**, 46 (2002).
5. S. Sorokina, S. Zaichkina, O. Rozanova, et al., in *Proc. 37th Ann. Meet. of the European Radiation Research Society*, Ed. by Jiri Skopek (Medimond Int. Proceed., Italy, 2009), pp. 79–82.
6. A. A. Sun, H. C. Yeh, L. H. Wang, et al., *Nutr. Cancer* **39** (1), 85 (2001).
7. О. В. Суркова, В. А. Бударков, Ю. Б. Кудряшов и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **50** (5), 536 (2010).
8. J. Guan, J. Stewart, J. H. Ware, et al., *Radiat. Res.* **165** (4), 373 (2006).
9. B. M. Rabin, B. Shukitt-Hale, A. Szprengiel, et al., *Brain Res.* **953**, 31 (2002).
10. B. M. Rabin, J. A. Joseph, B. Shukitt-Hale, et al., *Adv. Space Res.* **40**, 576 (2007).
11. M. Hada and A. Georgakilas, *Radiat. Res.* **49**, 203 (2008).
12. D. Li, G. Graef, J. A. Yee, et al., *J. Nutr.* **134**, 1536 (2004).
13. H. L. Newmark, K. Yang, M. Lipkin, et al., *Carcinogenesis* **22** (11), 1871 (2001).
14. T. Ushakova, H. Melkonyan, L. Nikonova, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 887 (1999).

Combined Effect of Dietary Supplements and Low-Dose-Rate High-LET Radiation on Mice *in vivo*

S.S. Sorokina*, S.I. Zaichkina*, O.M. Rozanova*, E.N. Smirnova*, S.P. Romanchenko*,
A.E. Shemyakov*, O.A. Vakhrusheva*, and V.N. Balakin**

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Physico-Technical Centre, Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
Akademicheskij proezd 2/110, Protvino, Moscow Region, 142280 Russia*

The purpose of this study is to investigate the combined action of food supplement and low-dose-rate high-LET radiation on radiosensitivity, induction of adaptive response and tumor growth on SHK mice *in vivo*. The animals were irradiated with 0.11 Gy (0.005 Gy/day) of low-dose-rate high-LET radiation behind the concrete shield of the 70 GeV protons accelerator (Protvino, Moscow region). Four groups of mice were fed with selected products (soybean meat, buckwheat, lettuce leaves and drug of cod-liver oil) during the whole irradiation period (22 days). The results of the study indicate that: due to the influence of high-LET radiation at a dose rate of 0.11 Gy, mice who had dietary supplement reduces the sensitivity of mice to X-radiation at a dose rate of 1.5 Gy and causes significant slowdown in growth of Ehrlich carcinoma. The combined effect of high-LET radiation and the food supplements mentioned above (except for cod-liver oil) reduces sensitivity of mice to irradiation at a dose rate of 1.5 Gy, induces adaptive response and causes the slowdown in the growth rate of Ehrlich carcinoma in contrast to the mice irradiated only with high-LET radiation.

Key words: low-dose rate high-LET radiation, dietary supplements, adaptive response, Ehrlich carcinoma, micronuclei, mice