

Н. М. Рябченко, О. Б. Ганжа, М. О. Дружина

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ

**ВПЛИВ ТОТАЛЬНОГО НИЗЬКОДОЗОВОГО ФРАКЦІОНОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ПОКАЗНИКИ РОСТУ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС МИШЕЙ**

Досліджено вплив тривалого фракціонованого опромінення в малих дозах на показники росту та інтенсивності метастазування карциноми легені Льюїс (КЛЛ) мишей. На фоні стимуляції росту первинного пухлинного вузла за дії іонізуючого випромінювання в режимі фракціонування дози спостерігали пригнічення процесів спонтанної дисемінації злоякісних клітин у легені: у дослідних тварин частота метастазування на 23-тю добу після інюкуляції клітин КЛЛ була на 25 % нижчою, ніж у контрольній групі, в опромінених тварин із метастатичними колоніями в легенях кількість і площа метастазів зменшилась у 1,6 та 1,7 раза відповідно. У віддалені терміни росту пухлини в опромінених тварин спостерігали істотне пригнічення функціональної активності макрофагів – центральної ланки неспецифічного протипухлинного імунітету.

*Ключові слова:* іонізуюча радіація в малих дозах, карцинома легені Льюїс мишей, неспецифічний протипухлинний імунітет.

**Вступ**

Проблема канцерогенної дії іонізуючих випромінювань (ІВ) у малих дозах викликає великий науковий і практичний інтерес та дискусії. На сьогодні фундаментальними та клінічними дослідженнями доведено, що ІВ у сублетальних дозах здатні істотно модифікувати процеси розвитку злоякісної патології, сприяючи процесам малігнізації нормальних клітин, формуванню нестабільності геному, змінюючи проліферативний та метастатичний потенціал злоякісних клітин, пригнічуючи імунітет, тощо.

В останні роки на противагу лінійній безпороговій концепції, що лежить в основі гігієнічного нормування ІВ та постулює ризик виникнення негативних стохастичних ефектів при опроміненні навіть дуже малою дозою, широку дискусію набувають результати досліджень феномену радіаційного гормезису. Особливу увагу привертає «парадигма корисної радіації» (*radiation benefit paradigm*) [1, 2], відповідно до якої в клітині існує універсальна система природного захисту (*radiation activated nature protection system*), що активується за дії ІВ та охоплює ієрархію захисних, адаптивних механізмів, що регулюються, найімовірніше, на епігенетичному рівні. На думку авторів парадигми, система природного захисту організму активується за умови опромінення в широкому діапазоні доз (від фонових до сублетальних) та ініціює такі процеси, як репарація пошкоджень ДНК, апоптоз аберантних клітин, епігенетичне репрограмування генів адаптивної відповіді, активацію протипухлинного імунітету, супресію запальних процесів тощо. Активація системи природного захисту, індукована ІВ у

малих дозах, може призводити до позитивних адаптивних реакцій організму на дію стрес-фактора і формування радіаційно-індукованого гормезису. Дійсно, дослідження адаптивної відповіді, радіаційної гіперчутливості, «ефекту свідка», радіаційно-індукованої нестабільності геному та інших «немішеневих» ефектів свідчать про необхідність перегляду патофізіологічних механізмів дії ІВ у малих дозах, особливо це стосується процесів радіаційно-індукованої злоякісної трансформації. У роботах останніх років наводяться результати експериментальних досліджень із використанням *in vitro* та *in vivo* моделей, які свідчать на користь «парадигми корисної радіації» у малих дозах: зокрема показано, що фракціоноване або одноразове тотальне опромінення експериментальних тварин у малих дозах до імплантації злоякісних клітин може пригнічувати їхню проліферацію та метастатичний потенціал [3 - 5]. Серед механізмів реалізації дії ІВ у малих дозах на показники розвитку злоякісного процесу слід відзначити, насамперед, активацію/пригнічення неспецифічного протипухлинного імунітету, епігенетичне репрограмування промоторів і супресорів злоякісної трансформації, репарації пошкоджень ДНК, апоптозу.

Таким чином, проблема характеру впливу ІВ у малих дозах на процеси злоякісної трансформації не має остаточного вирішення й потребує подальших досліджень.

Метою даної роботи було дослідити показники росту та метастазування карциноми легені Льюїс (КЛЛ) мишей, а також функціональну активність макрофагів за дії тотального фракціонованого опромінення тварин у діапазоні малих доз.

© Н. М. Рябченко, О. Б. Ганжа, М. О. Дружина, 2015

## Матеріали та методи дослідження

Робота виконана на експериментальній моделі метастазуючої КЛЛ мишей. У досліджах використовували самців мишей лінії С57В1/6 масою 20 - 22 г і віком 6 тижнів розведення віварію ІЕПОР НАН України. Процедури з експериментальними тваринами здійснювали згідно з міжнародними правилами (*European Communities Council Directive of November 24, 1986, 86/609/EEC*) та вимогами Державного комітету з етики.

Було сформовано 2 групи дослідних тварин по 16 особин у кожній: контрольна група – тварини з імплантованою КЛЛ та дослідна група – тварини з імплантованою КЛЛ, яких опромінювали в обраному режимі.

Тотальне опромінення тварин у сумарній дозі 1,0 Гр здійснювали фракціями по 0,1 Гр за 10 сеансів, двічі на тиждень на апараті РУМ-17: напруга на трубіці 200 кВ, струм 10 мА, фільтр 0,5 мм Сu + 1,0 мм Аl, шкірно-фокусна відстань 50 см, потужність дози опромінення 0,89 Гр/хв. Після двох сеансів опромінення (сумарна доза опромінення 0,2 Гр) тваринам перещеплювали клітини КЛЛ.

Інокуляції клітин КЛЛ (штам банку клітин ІЕПОР НАН України) мишам здійснювали відповідно до стандартних методик [6]. У тварин-донорів вирізали шматочки пухлини без некротичних ділянок, подрібнювали за допомогою механічного гомогенізатора та вводили внутрішньом'язево по  $2,5 \cdot 10^5$  клітин у 0,2 мл фізіологічного розчину на кожну тварину.

Вивчення кінетики росту пухлин проводили впродовж 14 - 23 діб шляхом вимірювання трьох взаємно перпендикулярних розмірів пухлинного вузла ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ). Об'єм пухлини визначали за формулою  $V = a \cdot b \cdot c \cdot 0,5$ . Індекс пригнічення/стимуляції росту пухлини (ІРП) визначали за формулою  $ІРП = (A - B) / A \cdot 100 \%$ , де  $A$  – середня маса пухлини (на 23-тю добу) у контрольній групі,  $B$  – середня маса пухлини (на 23-тю добу) у дослідній групі. На 23-тю добу тварин виводили з експерименту декапітацією під наркозом, виділяли легені та підраховували на їхній поверхні загальну кількість макроскопічних колоній КЛЛ, пофарбованих розчином Буена. Враховували, що метастази КЛЛ мали переважно субплевральну локалізацію.

Для оцінки інтенсивності процесу метастазування використовували такі критерії: 1) частоту метастазування пухлин, яку визначали за відношенням кількості тварин із метастазами до загальної кількості тварин у групі; 2) середню кількість метастазів у тварини із групи; 3) середню площу метастатичного ураження; 4) індекс при-

гнічення метастазування (ІПМ) за формулою  $ІПМ = (A_K \cdot V_K - A \cdot B) / (A_K \cdot V_K) \cdot 100 \%$ , де  $A_K$  – частота метастазування в контрольній групі;  $A$  – частота метастазування в дослідній групі;  $V_K$  – середня кількість метастазів у тварин контрольної групи;  $B$  – середня кількість метастазів у тварин дослідної групи.

Функціональну активність перитонеальних макрофагів визначали за тестом відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [7]. Вимірювання проводили на автоматичному планшетному рідері Sinergy (США) при довжині хвилі 620 нм у спеціальних 96-лункових планшетах.

Рівень генерації супероксидного аніон-радикала визначали в суспензії перитонеальних макрофагів за допомогою методу хемілюмінесценції з використанням індикатора люцигеніну [8].

Статистичну достовірність різниці між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона - Манна - Уїтні, а також критерію Стьюдента при  $p < 0,05$  із використанням програми «Statistica 6,0».

## Результати та обговорення

В експериментальній онкології КЛЛ є стандартною моделлю штучного метастазування, що належить до нечисленої групи експериментальних пухлин, здатних до спонтанного метастазування із первинного осередку пухлини в легені. Вона широко використовується при вивченні впливу протипухлинних препаратів. Підшкірна інокуляція клітин КЛЛ дослідній тварині (на протипухлинній відповіді на дію цитотоксичних агентів. У даній роботі було обрано схему тотального опромінення, що передбачала попереднє (до інокуляції клітин КЛЛ) фракціоноване опромінення тварин у сумарній дозі 0,2 Гр (2 сеанси по 0,1 Гр) і наступне фракціоноване опромінення тварин із метою з'ясування впливу обраної схеми на подальший розвиток пухлинного процесу, інтенсивності метастазування та функціональну здатність макрофагів як однієї з найважливіших ланок неспецифічного протипухлинного імунітету та їхньої імовірної ролі у процесах стимуляції/пригнічення росту КЛЛ.

Попереднє опромінення тварин не впливало на ефективність трансплантації пухлинних клітин, яка в обох групах була 100 %. Вивчення кінетики росту КЛЛ показало, що пролонговане опромінення тварин у режимі фракціонування по

0,1 Гр двічі на тиждень призвело до стимуляції росту первинного вузла пухлини (рис. 1). У тварин дослідної групи в 1,4 раза скоротився латентний період росту пухлини (візуальна оцінка появи видимих підшкірних пухлинних вузлів об'ємом близько 0,06 см<sup>3</sup>), що становив 8,8 ± ± 2,8 доби. Достовірну різницю середніх значень об'єму пухлин у дослідних групах спостерігали вже на 14-ту добу після інокуляції. На 23-тю добу росту пухлини в обох групах виживаність тварин була 100 %, проте середня маса та об'єм пухлинного вузла у тварин дослідної групи були більші в середньому в 1,7 та 1,8 раза відповідно. Індекс стимуляції росту пухлини, визначений за її масою на 23-тю добу росту, становив 65,5 %. Посилення росту пухлини в модельному експерименті (карцинома Герена щурів) при фракціонованому опроміненні в малих дозах спостерігалось в інших наших дослідженнях [9].

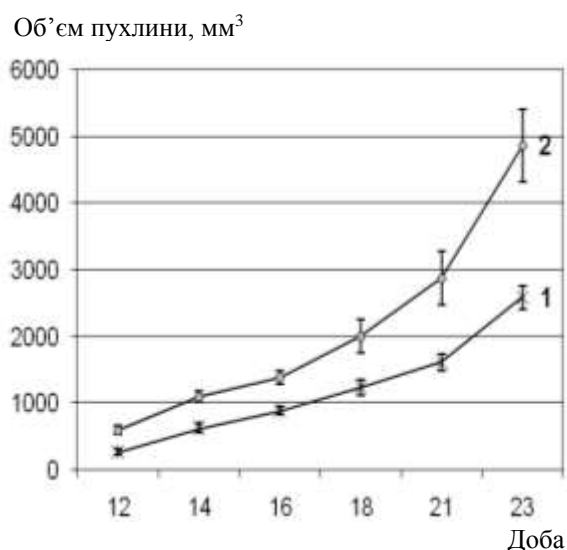


Рис. 1. Кінетика росту КЛЛ за дії пролонгованого фракціонованого випромінювання в малій дозі: 1 – контрольна група; 2 – група опромінення.

На фоні стимуляції росту пухлинного вузла за дії ІВ в обраному режимі фракціонування дози спостерігали пригнічення інтенсивності спонтанного метастазування клітин КЛЛ у легені: кількість опромінених тварин із метастазами на 23-тю добу після інокуляції клітин КЛЛ була на 25 % менше, ніж у контрольній групі, а кількість і площа метастазів зменшились у 1,6 та 1,7 раза відповідно. Маса легень у групах достовірно не відрізнялась і була у середньому 315,5 ± 28,3 мг у контролі та 302,6 ± 16,4 мг у тварин дослідної групи. При цьому індекс пригнічення метастазування становив 48 %.

За дії іонізуючої радіації в малих дозах важко співвіднести її антинеопластичні ефекти із прямим механізмом ураження тканини пухлини,

найчастіше розглядають опосередковані механізми активації процесів репарації/регенерації сублетальних пошкоджень нормальних тканин, зокрема гемопоетичної. Одним з імовірних механізмів про-/антинеопластичних ефектів ІВ у малих дозах вважають пригнічення/активацію неспецифічного протипухлинного імунітету, що зумовлено цитотоксичними властивостями макрофагів та природних кілерних (NK) клітин. У даній роботі динаміку імунної відповіді організму мишей після перещеплення пухлини оцінювали за показниками функціональної здатності перитонеальних макрофагів. Дані щодо їхньої функціональної активності за НСТ-тестом показали, що ріст КЛЛ сам по собі характеризувався поступовим зростанням функціональної активності перитонеальних макрофагів (до 39 % на 23-тю добу росту пухлини). При опроміненні, навпаки, із збільшенням сумарної поглинутої дози в режимі фракціонування до 1,0 Гр спостерігали поступове її пригнічення до 62 % відносно контрольного значення на 23-тю добу росту пухлини.

На ранніх етапах росту КЛЛ спостерігали активацію напрацювання супероксидного аніон-радикала із максимумом на 7-му добу пухлинного росту. Надалі рівень генерації супероксиду макрофагами дещо знижувався, досягаючи контрольних значень на термінальній стадії розвитку КЛЛ. За дії ІВ максимум генерації супероксидного аніон-радикала реєстрували на 15-ту добу росту пухлини (рис. 2). У цей же період (13 - 15-та доба росту КЛЛ), за даними авторів [3], спостерігається найінтенсивніший вихід метастазуючих клітин КЛЛ із первинного вузла. Вочевидь, що підвищена активація функціональної здатності макрофагів за дії фракціонованого ІВ у малих дозах у цей період могла впливати на інтенсивність метастазування. Проте її виснаження в більш віддалений період свідчить про негативні ефекти довготривалого фракціонованого опромінення в малих дозах на імунну систему, що підтверджують дані інших дослідників [10].

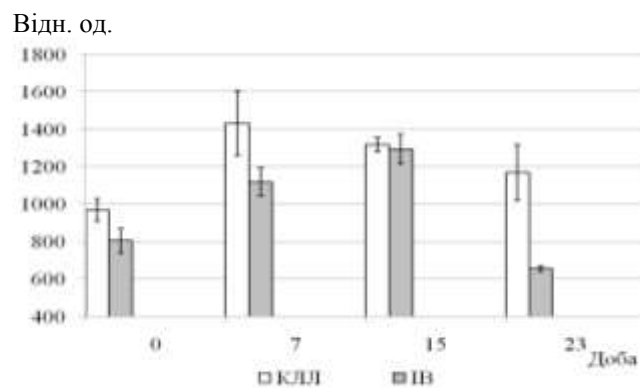


Рис. 2. Рівень генерації супероксидного аніон-радикала в перитоніальних макрофагах дослідних мишей.

Пригнічення метастазування за дії ІВ у малих дозах спостерігали при фракціонованому опроміненні тварин у сумарній дозі 0,2 Гр і наступній внутрішньовенній інокуляції клітин метастазуючої у легені саркоми L1 [4, 11]. Антиметастатичні ефекти іонізуючої радіації в малих дозах автори досліджень пов'язують з індукованою активацією неспецифічного імунного захисту макрофагів та НК клітин. Проте можна припустити, що про/антинеопластичні ефекти малих доз радіації залежать не тільки від стану протипухлинного імунітету на момент перещеплення, а й від фактора сумарної поглинутої дози, її розподілу між фракціями, часу до/після перещеплення злоякісних клітин, відновлення опромінених тканин тощо, що може призводити на ранніх етапах до більшої активації цієї ланки імунітету, а у більш віддалені терміни – до її інтенсивнішого виснаження. На нашу думку, іншим імовірним поясненням пригнічення метастазування на фоні стимуляції росту первинного вузла, в якому клі-

тини знаходяться в умовах зростаючої гіпоксії, може бути підвищення оксигенації пухлинних клітин у легневих колоніях за рахунок опромінення, що і призвело в нашому досліді до зменшення кількості та площі колоній.

### Висновки

Одержані дані свідчать, що ІВ у режимі фракціонування в малих дозах є істотним модифікатором зляккісного росту, що проявляється як у впливі на інтенсивність росту пухлини, так і в дисемінації клітин КЛЛ в інші органи.

За обраного режиму тотального фракціонованого опромінення тварин у малих дозах відбувалась стимуляція росту первинного вузла перещепленої КЛЛ на фоні пригнічення метастатичного ураження легень та поступового пригнічення (із збільшенням поглинутої дози) функціональної активності перитоніальних макрофагів – центральної ланки неспецифічного протипухлинного імунітету.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Martin L.M., Marples B., Lynch T.H. et al.* Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences // *Cancer Lett.* - 2013. - Vol. 338 (2). - P. 209 - 218.
2. *Feinendegen L.* Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis // *Br. J. Radiol.* - 2005. - Vol. 78. - P. 3 - 7.
3. *Hosoi Y., Sakamoto K.* Suppressive effect of low dose total body irradiation on lung metastasis: dose dependency and effective period // *Radiother. Oncol.* - 1993. - Vol. 26. - P. 177 - 179.
4. *Cheda A., Wrembel-Wargocka J., Lisiak E.* Single Low Doses of X-Rays Inhibit the Development of Experimental Tumor Metastases and Trigger the Activities of NK Cells in Mice // *Radiat. Res.* - 2004. - Vol. 161. - P. 335 - 340.
5. *Scott B.R., Bruce V.R., Gott K.M. et al.* Small  $\gamma$ -Ray Doses Prevent Rather than Increase Lung Tumors in Mice // *Dose Response.* - 2012. - Vol. 10 (4). - P. 527 - 540.
6. *Anticancer Drug Development Guide.* Preclinical screening, clinical trials, and approval. 2-nd ed. / Ed. by B. A. Teicher and P. A. Andrews. - Totowa - New Jersey: Humana Press, 2004. - 450 p.
7. *Гончаров А.Г., Фрейдлин И.С., Смирнов В.С. и др.* Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса / Под ред. М. Г. Романцева. - Калининград: Калининградский университет, 1997. - 73 с.
8. *Liochev S.I., Fridovich I.* Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Mediator of Superoxide Anion Production // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 1997. - Vol. 337, No. 1. - P. 115 - 120.
9. *Gerashchenko B.I., Ryabchenko N.M., Glavin O.A. et al.* Fractionated low-dose radiation exposure potentiates proliferation of implanted tumor cells // *Experimental Oncology.* - 2013. - No. 1. - P. 69 - 71.
10. *Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V. et al.* Fractionated Low-Dose Radiation Exposure Leads to Accumulation of DNA Damage and Profound Alterations in DNA and Histone Methylation in the Murine Thymus // *Mol. Cancer Res.* - 2005. - No. 3. - P. 553 - 561.
11. *Nowosielska E.M., Cheda A., Wrembel-Wargocka J. et al.* Anti-neoplastic and immunostimulatory effects of low-dose X-ray fractions in mice // *Int. J. Rad. Biol.* - 2011. - Vol. 87. - P. 202 - 212.

**Н. Н. Рябченко, Е. Б. Ганжа, Н. А. Дружина**

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев*

### **ВЛИЯНИЕ ТОТАЛЬНОГО НИЗКОДОЗОВОГО ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ**

Изучено влияние длительного фракционированного облучения в малых дозах на показатели роста и интенсивности метастазирования карциномы легкого Льюис (КЛЛ) мышей. На фоне стимуляции роста первичного узла опухоли при действии ионизирующей радиации в режиме фракционирования дозы наблюдали угнетение процессов спонтанной диссеминации злокачественных клеток в легкие: в группе облучения частота метастазирования на 23-е сутки после инокуляции клеток КЛЛ была на 25 % ниже, чем у животных контрольной группы, у облученных животных с метастатическими колониями в легких количество и площадь метастазов уменьши-

лись в 1,6 и 1,7 раза соответственно. В отдаленные сроки роста опухоли у облученных животных наблюдали существенное угнетение функциональной активности макрофагов – центрального звена неспецифического противоопухолевого иммунитета.

*Ключевые слова:* ионизирующая радиация в малых дозах, карцинома легкого Льюис мышей, неспецифический противоопухолевый иммунитет.

**N. M. Ryabchenko, O. B. Ganzha, M. O. Druzhyna**

*Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### **INFLUENCE OF TOTAL LOW DOSE FRACTIONATED RADIATION ON GROWTH AND METASTASIS OF MICE LEWIS LUNG CARCINOMA**

Effects of prolonged fractionated ionized radiation in low doses on the growth and metastasis intensity of mice Lewis lung carcinoma (LLC) are studied. On the background of tumor growth stimulation induced by irradiation in the selected mode of dose fractionation inhibition of spontaneous dissemination of tumor cells into lungs is observed. On the 23-rd day after cell inoculation metastases incidence in irradiated animals was 25 % lower; the number and size of lung metastases decreased by 1.6 and 1.7 times. In the remote terms of tumor growth inhibition of functional activity of macrophages – central effectors of non-specific anti-tumor immunity was revealed.

*Keywords:* low dose ionizing radiation, mice Lewis lung carcinoma, nonspecific antitumor immune response.

#### REFERENCES

1. *Martin L.M., Marples B., Lynch T.H. et al.* Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences // *Cancer Lett.* - 2013. - Vol. 338 (2). - P. 209 - 218.
2. *Feinendegen L.* Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis // *Br. J. Radiol.* - 2005. - Vol. 78. - P. 3 - 7.
3. *Hosoi Y., Sakamoto K.* Suppressive effect of low dose total body irradiation on lung metastasis: dose dependency and effective period // *Radiother. Oncol.* - 1993. - Vol. 26. - P. 177 - 179.
4. *Cheda A., Wrembel-Wargoicka J., Lisiak E.* Single Low Doses of X-Rays Inhibit the Development of Experimental Tumor Metastases and Trigger the Activities of NK Cells in Mice // *Radiat. Res.* - 2004. - Vol. 161. - P. 335 - 340.
5. *Scott B.R., Bruce V.R., Gott K.M. et al.* Small  $\gamma$ -Ray Doses Prevent Rather than Increase Lung Tumors in Mice // *Dose Response.* - 2012. - Vol. 10 (4). - P. 527 - 540.
6. *Anticancer Drug Development Guide.* Preclinical screening, clinical trials, and approval. 2-nd ed. // Ed. by B. A. Teicher and P. A. Andrews. - Totowa - New Jersey: Humana Press, 2004. - 450 p.
7. *Goncharov A.G., Freydlin I.S., Smirnov V.S. et al.* / Ed. M. G. Romantseva. - Kaliningrad: Kaliningradskiy universitet, 1997. - 73 p. (Rus)
8. *Liochev S.I., Fridovich I.* Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Mediator of Superoxide Anion Production // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 1997. - Vol. 337, No. 1. - P. 115 - 120.
9. *Gerashchenko B.I., Ryabchenko N.M., Glavin O.A. et al.* Fractionated low-dose radiation exposure potentiates proliferation of implanted tumor cells // *Experimental Oncology.* - 2013. - No 1. - P. 69 - 71.
10. *Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V. et al.* Fractionated Low-Dose Radiation Exposure Leads to Accumulation of DNA Damage and Profound Alterations in DNA and Histone Methylation in the Murine Thymus // *Mol. Cancer Res.* - 2005. - No 3. - P. 553 - 561.
11. *Nowosielska E.M., Cheda A., Wrembel-Wargoicka J. et al.* Anti-neoplastic and immunostimulatory effects of low-dose X-ray fractions in mice // *Int. J. Rad. Biol.* - 2011. - Vol. 87. - P. 202 - 212.

Надійшла 07.04.2015

Received 07.04.2015