

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК КЛЕТОК МЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АТМОСФЕРНЫХ ФАКТОРОВ

© 2019 г. Е.А. Кузнецова\*, Н.П. Сирота\*, Т.А. Зенченко\* \*\*

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

\*\*Институт космических исследований РАН, 117997, Москва, ул. Профсоюзная, 84/32

E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2019 г.

После доработки 27.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Изучено изменение уровней повреждений ДНК по показателю %TDNA – процентной доли ДНК в хвосте «кометы», определенной методом «комета-теста» в лейкоцитах крови, клетках асцитной карциномы Эрлиха и лимфолейкоза Р388 мышей, в зависимости от атмосферных факторов. Показано, что: повышенные значения %TDNA лейкоцитов регистрировались в узких диапазонах атмосферной температуры (от  $-4^{\circ}\text{C}$  до  $+3^{\circ}\text{C}$ ) и парциального содержания кислорода воздуха (298–304 мг/л); по мере роста уровня геомагнитной активности увеличивался диапазон вариаций %TDNA лейкоцитов; изменения %TDNA интактных или X-облученных (4 Гр) лейкоцитов и опухолевых клеток ассоциированы с изменениями температуры воздуха; выявлена корреляция между температурой и %TDNA обоих видов интактных опухолевых клеток и облученных клеток Р388. Можно полагать, что вариации %TDNA связаны с воздействием активных форм кислорода, формирующихся в окружающей среде при температурах фазовых переходов воды. Изменения базального уровня %TDNA клеток, по-видимому, могут приводить к изменению их радиационного ответа.

*Ключевые слова:* comet assay, кровь мыши, клетки асцитной карциномы Эрлиха, клетки лимфолейкоза Р388, рентгеновское излучение, температура воздуха

DOI: 10.1134/S0006302919030050

В исследованиях на уровне организма в работах различных авторов многократно продемонстрировано, что показатели сердечно-сосудистой системы человека изменялись под воздействием факторов земной и космической погоды [1]. Так, на основании анализа динамики показателей артериального давления и микроциркуляции крови у здоровых волонтеров сделано заключение, что для климатического пояса Москвы и более северных широт наиболее биотропным атмосферным фактором являются вариации температуры воздуха, причем зависимость проявляется как синхронизация медленных волн физиологических и атмосферных показателей длительностью несколько суток. [2–4]. К сожалению, значительная вариабельность амплитуд и даже знаков обнаруженных эффектов, обусловленная, по-видимому, их зависимостью от текущего состояния, как са-

мого человека, так и условий окружающей среды, не позволяет в настоящее время построить достаточно полную непротиворечивую модель реакции организма человека на комплекс факторов земной и космической погоды [1]. В отличие от человека, лабораторные животные находятся в стандартных стационарных условиях (местоположение, освещенность, рацион питания). Они не подвергаются воздействиям, связанным с разнообразием питания, передвижением, общением с новыми индивидуумами, получением различной информации и самовнушением. Несмотря на это, при проведении многочисленных экспериментов мы обнаружили, что в разные дни некоторые показатели у одних и тех же клеточных популяций отличались друг от друга. Так, в экспериментах по определению уровней повреждений ДНК лейкоцитов крови мышей методом «комета-теста» было обнаружено, что изменялся базальный уровень повреждений ДНК в разные дни. В этой связи было интересно выяснить, существует ли зависимость наблюдающихся вариаций %TD-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, ГМА – геомагнитная активность.

НА (процентной доли ДНК в хвосте «кометы», определенной методом «комета-теста») от атмосферных факторов, используя биологические модели — мышинные клетки — при дополнительной генотоксической нагрузке и без нее. В норме уровень повреждений ДНК индивидуальных клеток отражает процессы как возникновения повреждений, так и их репарации в ДНК, поскольку ДНК клеток постоянно подвергается спонтанной тепловой и гидролитической деградации, окислению и неферментативному метилированию. Так, только за счет апуринизации и окисления активными формами кислорода (АФК) в ДНК одной нормальной клетки человека в течение одного часа возникает около 1000 поврежденных оснований, что примерно равно количеству таких же повреждений при гамма-облучении клеток в дозе 0,5 Гр. Как правило, эти повреждения ДНК постоянно подвергаются репарации [5]. Повышение базального уровня повреждений ДНК лейкоцитов может свидетельствовать об атаках генотоксических физико-химических факторов, например, АФК, что может сказаться на функционировании ряда систем организма, в том числе сердечно-сосудистой системы. Поскольку воздействие редкоизионизирующего излучения можно рассматривать как атаку АФК, где основным повреждающим фактором являются ОН-радикалы [6], то в качестве такой генотоксической нагрузки мы использовали воздействие рентгеновского излучения на клетки. Широкий спектр повреждений ДНК — одно- и двунитевые разрывы, реализованные в разрывы щелочелабильные (апуриновые/апириимидиновые) сайты — позволяет выявить щелочная версия метода «комета-теста» (метод ДНК-комет, comet assay) [7]. В этой работе методом «комета-теста» оценивали уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови нормальных мышей и клеток асцитной карциномы Эрлиха или мышинного лимфолейкоза Р388 до и после воздействия рентгеновского излучения (Х-облучения) на эти клетки *in vitro*.

Цель работы: выявить, как соотносятся уровни повреждений ДНК интактных или Х-облученных лейкоцитов периферической крови или опухолевых клеток мышей с изменениями показателей атмосферного давления, температуры воздуха, его относительной влажности, парциального содержания кислорода и уровня геомагнитной активности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клетки.** Использовали мышей-самцов неинbredной линии SHK, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Аликвоты крови (5 мкл), взятые при надрезании кончика хвоста, отбирали в пробирки с фосфатно-солевым буфером (136,7 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), содержащим 0,001 М ЭДТА.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха (клетки АКЭ), взятые на седьмые сутки после прививки мышам-самцам неинbredной линии SHK, содержащимся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН, были получены, как указано в работах [8,9], и предоставлены для исследования С.П. Романченко (лаборатория клеточной инженерии ИТЭБ РАН). Суспензию клеток трижды промывали раствором Хенкса, их количество подсчитывали в камере Горяева.

Инокулят клеток лимфолейкоза Р388 (клетки Р388) был получен от В.В. Шапошниковой из лаборатории окислительного стресса ИТЭБ РАН. Клетки лимфолейкоза Р388 выращивали в брюшной полости мышей-самцов линии DBA 2 (получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН), прививали внутрибрюшинно  $2 \cdot 10^6$  клеток на мыш. Через семь суток после прививки мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, извлекали клетки из брюшной полости, промывали средой RPMI 1640 (Sigma, США) и подсчитывали в камере Горяева.

Для приготовления агарозных слайдов использовали цельную кровь мышей, разведенную содержащим ЭДТА фосфатно-солевым буфером в шесть раз; клетки АКЭ разводили раствором Хенкса, клетки Р388 — средой RPMI 1640 до концентрации  $1 \cdot 10^6$  кл/мл.

Работу с животными проводили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН.

**Облучение.** Клетки крови, АКЭ или Р388 были облучены в составе агарозных слайдов на льду. Облучение проводили на рентгеновской установке РУТ-250-15-1 в ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН (Пушино Московской области) при мощности дозы 1,12 Гр/мин, напряженности 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтрах 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусном расстоянии 37 см. Дозиметрию проводили по методу Фрике в присутствии бензойной кислоты и с помощью дозиметра VA-J-18 (RFT Messelektronik, Германия). Слайды сразу после облучения помещали в охлажденный лизирующий раствор.

**Метод «комета-теста».** Вначале предметные стекла погружали в раствор 1%-й агарозы и высушивали. На эти стекла наносили слой 1%-й агарозы и инкубировали в холодильнике до ее затвердевания (5–7 мин). Разведенную кровь или суспензию клеток смешивали с равным объемом 1%-й легкоплавкой агарозы (Sigma, США), расплавленной при 70°C в фосфатно-солевом буфере, содержащем ЭДТА, и инкубируемой при 37°C (конечная температура получаемой смеси 20–22°C). Смесь (15 мкл) наносили на приготовленный агарозный слой. После охлаждения и застывания содержащей

клетки агарозы на ее поверхность наносили новый слой 0,5%-й легкоплавкой агарозы и инкубировали в холодильнике до затвердевания. Слайды подвергали воздействию рентгеновского излучения и затем помещали в лизирующий раствор (2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 10, 1% тритона X-100) при 4°C на ночь. Затем следовала процедура денатурации ДНК – слайды перемещали на 20 мин в щелочной раствор «А» (0,3 М NaOH, 0,001 М ЭДТА, pH > 13). Для всех экспериментов процедуру денатурации проводили при 4°C, за исключением экспериментов с кровью, полученной из одной мыши, а именно: денатурацию ДНК проводили как при 4°C, так и при 20°C. Далее слайды переносили в электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Москва) и подвергали электрофорезу в свежей порции раствора «А» в течение 20 мин при 4°C, при объеме буфера 250 мл, напряжении 27 В, силе тока 260–270 мА (напряженность электрического поля 2 В/см). Все эксперименты проводили с использованием одной и той же электрофоретической камеры. После электрофореза слайды промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 1 ч в фосфатно-солевом буфере, содержащем 2,0 мкг/мл этидиум бромид. Слайды анализировали под флуоресцентным микроскопом ЛЮМАМ И-3 («ЛОМО», Санкт-Петербург). Захват изображений проводили цифровым фотоаппаратом CoolPix 995 (Nikon, Япония) с последующей передачей изображений в компьютер. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, где реализованы алгоритмы расчета стандартных параметров «комет» [10]. Для оценки уровня повреждений ДНК использовался параметр, представляющий процент ДНК в хвосте «кометы» (percent of DNA in a comet tail – %TDNA). Для каждой экспериментальной точки анализировали по три слайда, вычисляя средние значения %TDNA и фотографируя не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно рекомендациям, сделанным в работе [11].

**Метеорологические показатели и анализ результатов.** Данные значений метеорологических параметров были получены с сайта <https://tr5.ru/> по г. Серпухов (30 км от места проведения экспериментов), по уровню геомагнитной активности – с сайта [ftp://ftp.ngdc.noaa.gov/STP/GEOMAGNETIC\\_DATA/INDICES/KP\\_AP](ftp://ftp.ngdc.noaa.gov/STP/GEOMAGNETIC_DATA/INDICES/KP_AP).

В расчетах были использованы среднесуточные значения, полученные вычислением среднего арифметического для атмосферного давления ( $P_{\text{атм}}$ ), температуры ( $T_{\text{атм}}$ ), относительной влажности ( $RH$ , Relative Humidity) и суммированием для  $K_p$ -индекса, т.е. планетарного индекса геомагнитной активности (ГМА), восьми трехчасовых показателей.

Весовое (парциальное) содержание кислорода в атмосферном воздухе –  $P(O_2)$  было рассчитано по формуле Клапейрона:

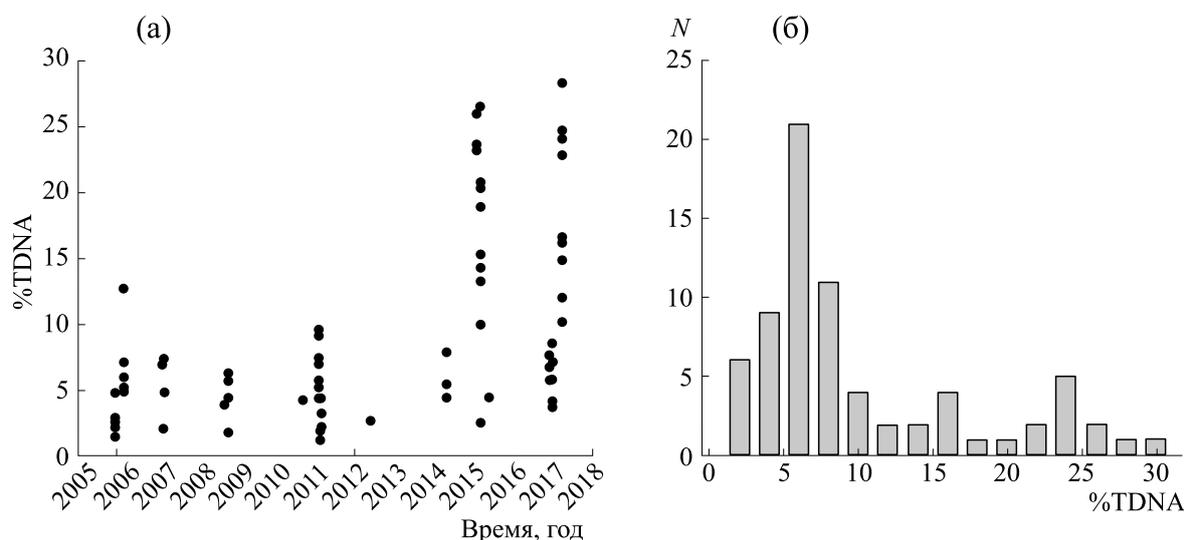
$$P = \frac{P_{\text{атм}} - e}{R \cdot T} \cdot 0,232 = 80,83 \frac{P_{\text{атм}} - e}{T} \text{ (г/м}^3\text{)}, \quad (1)$$

где  $P_{\text{атм}}$  и  $e$  – соответственно атмосферное давление и абсолютная влажность воздуха (в гПа),  $T$  – температура воздуха в К,  $R$  – газовая постоянная для сухого воздуха, равная 287 Дж/(кг·К), 0,232 – весовая доля кислорода в сухом воздухе.

Для оценки возможной зависимости значений биологических показателей от атмосферных и геомагнитных факторов использовали методы корреляционного, регрессионного и дисперсионного анализов. Поскольку для большинства проанализированных выборочных распределений биологических показателей не выполнялась гипотеза о нормальности распределения (согласно критерию Жарка–Берра), были использованы непараметрические методы оценки, а именно: расчет рангового коэффициента корреляции Спирмена и критерий Вилкоксона для оценки различия выборок. Поскольку большинство обнаруженных зависимостей имели нелинейный характер, был использован коэффициент детерминации ( $R^2$ ), полученный при аппроксимации данной зависимости полиномом второй степени.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Вначале мы проанализировали изменения уровней повреждений ДНК лейкоцитов из крови интактных мышей. Для анализа был использован массив значений %TDNA лейкоцитов, полученный в экспериментах 2005–2017 гг., и каждой величине %TDNA соответствовали среднесуточные значения атмосферного давления, температуры воздуха, относительной влажности, содержания кислорода и уровня ГМА, оцененного по  $K_p$ -индексу. На рис. 1 показаны распределения %TDNA из использованного массива данных по датам экспериментов и по наблюдаемым значениям. Из представленных 73 значений %TDNA 47 значений имели величину менее 10, и их распределение на гистограмме подчинялось нормальному закону (рис. 1б). В то же время 25 значений имели большую величину, и на графике выборочного распределения их можно рассматривать либо как «тяжелый хвост», либо как второе колоколообразное распределение с максимумом в районе 25. Видно также, что значения %TDNA > 10 наблюдались неоднократно, а именно в четырех сериях экспериментов (04.02.2015, 04.03.2015, 13.03.2015 и 30.03.2017). Если весь массив данных разбить по месяцам проведения наблюдений, то достаточно большие, сопоставимые между собой по величине выборки наблюдались для следующих перио-



**Рис. 1.** Распределение значений %TDNA лейкоцитов крови интактных мышей из использованного массива данных по датам экспериментов (а) и по наблюдаемым величинам (б).

дов года: (а) — сентябрь—декабрь (22 измерения), (б) — февраль (16 измерений), (в) — март (29 измерений). Распределения выборочных значений, полученных для данных периодов, приведены на рис. 2. Видно, что в измерениях разных лет, проведенных в сентябре—декабре, не встречались повышенные значения %TDNA, в феврале такие значения составляли 19%, а в марте — 62%.

На рис. 3 показаны распределения %TDNA по синхронным значениям температуры воздуха (рис. 3а), парциального содержания кислорода в воздухе (рис. 3б), атмосферного давления (рис. 3в) и относительной влажности (рис. 3г). Из рис. 3а видно, что все (за исключением одного) повышенные относительно фона значения %TDNA ( $\%TDNA > 10$ ) располагались в узком диапазоне температур ( $-4^{\circ}\text{C} - +3^{\circ}\text{C}$ ), составляющем менее четверти всего наблюдаемого диапазона. Аналогичная картина наблюдалась на рис. 3б: все повышенные значения %TDNA располагались в диапазоне концентраций  $P(\text{O}_2)$  298–304 мг/л, относительная ширина которого составляла всего 15% от диапазона значений  $P(\text{O}_2)$ , встретившихся в эксперименте. С учетом достаточно равномерного распределения значений %TDNA  $< 10$  вероятность случайного одновременного попадания всех 25 повышенных значений, наблюдавшихся в эксперименте, в интервал значений  $P(\text{O}_2)$  шириной 0,15 составляла крайне малую величину ( $p \approx 0,15^{24}$ ). В меньшей степени тенденция группирования повышенных значений %TDNA наблюдалась на распределении по величинам  $P_{\text{атм}}$ . Как видно из рис. 3в, пять показателей %TDNA  $> 10$  не попадали в узкий интервал значений атмосферного давления. В случае же распределения

по величинам относительной влажности значения %TDNA  $> 10$  наблюдались как при высоких, так и при низких значениях  $RH$  (рис. 3г). Необходимо отметить, что, как видно из формулы (1), расчетное значение парциального содержания кислорода в воздухе в наибольшей степени зависело от соответствующей ему величины температуры, в меньшей степени — от атмосферного давления и крайне слабо — от значения относительной влажности. Можно полагать, что повышенные значения %TDNA зависят от показателя  $P(\text{O}_2)$ , реализуясь в очень узком диапазоне его значений, а менее выраженные неоднородности распределений %TDNA от  $T_{\text{атм}}$  и  $P_{\text{атм}}$  являются следствием функциональной связи этих атмосферных показателей со значениями  $P(\text{O}_2)$ . То есть изменения %TDNA лейкоцитов крови мышей были ассоциированы с вариациями температуры воздуха и парциального содержания кислорода в окружающей среде.

Поскольку повышенные значения %TDNA наблюдались в феврале—марте (рис. 2) и именно на этот период приходился максимум внутригодового распределения уровня ГМА, чтобы проверить возможную зависимость показателя %TDNA от уровня ГМА было построено распределение выборочных значений %TDNA от  $K_p$ -индекса (рис. 4). Расчет рангового коэффициента корреляции между %TDNA и соответствующими значениями  $K_p$ -индекса давал величину  $r_s = 0,318$  с уровнем статистической значимости  $p = 0,006$ , однако, как и в случае атмосферных факторов, вид зависимости был более сложным, чем прямая пропорциональность, выявляемая методом корреляционного анализа. Из рис. 4 видно, что при

низком уровне ГМА высокие значения %TDNA не наблюдались, а по мере роста возмущенности геомагнитной обстановки увеличивался и диапазон значений %TDNA: чем выше было текущее значение  $K_p$ -индекса, тем выше располагалась верхняя грань наблюдаемых значений %TDNA.

Чтобы выяснить, как изменяются уровни повреждений ДНК клеток при генотоксической нагрузке, в качестве источника АФК использовали воздействие рентгеновского излучения на клетки *in vitro*. Для того чтобы избежать индивидуальных различий, обычно наблюдаемых в группе животных, все эксперименты были проведены на крови, полученной от одной мыши в разные дни. На рис. 5 показаны изменения %TDNA облученных в дозе 4 Гр лейкоцитов периферической крови мыши и соответствующих среднесуточных температур воздуха в дни отбора проб крови. Уровень повреждений ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных и необлученных лейкоцитов. Показаны данные двух вариантов экспериментов, в которых проводилась денатурация ДНК (один из этапов метода «комета-теста»): при стандартной температуре 4°C и при 20°C. Различия значений %TDNA для необлученных (контрольных) клеток при разных температурах денатурации были статистически недостоверны. Видно, что при одной и той же дозе облучения в случае денатурации при 20°C наблюдался более высокий уровень повреждений ДНК, чем при 4°C, и что в дни, когда температура воздуха не превышала +4°C, показатель %TDNA увеличивался. Таким образом, изменение значений %TDNA облученных лейкоцитов было ассоциировано с изменением температуры воздуха. Несмотря на то, что среди проанализированных величин %TDNA у необлученных лейкоцитов не встречалось значений выше 10, эти данные входили в массив, для которого в приведенном выше исследовании была обнаружена зависимость %TDNA от температуры воздуха и парциального содержания кислорода.

На рис. 6 показаны изменения %TDNA клеток АКЭ и соответствующих среднесуточных температур воздуха в дни отбора асцита. Уровень повреждений ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных в дозе 4 Гр и необлученных клеток. Видно, что эти изменения %TDNA ассоциированы с изменениями температуры воздуха. При этом изменения температуры несколько опережали изменения %TDNA. Для %TDNA необлученных клеток АКЭ была обнаружена статистически значимая корреляция с синхронными значениями атмосферной температуры воздуха ( $r_s = 0,577, p < 0,05$ ).

На рис. 7 показаны изменения %TDNA клеток P388 и соответствующих среднесуточных температур воздуха в дни отбора асцита. Уровень по-

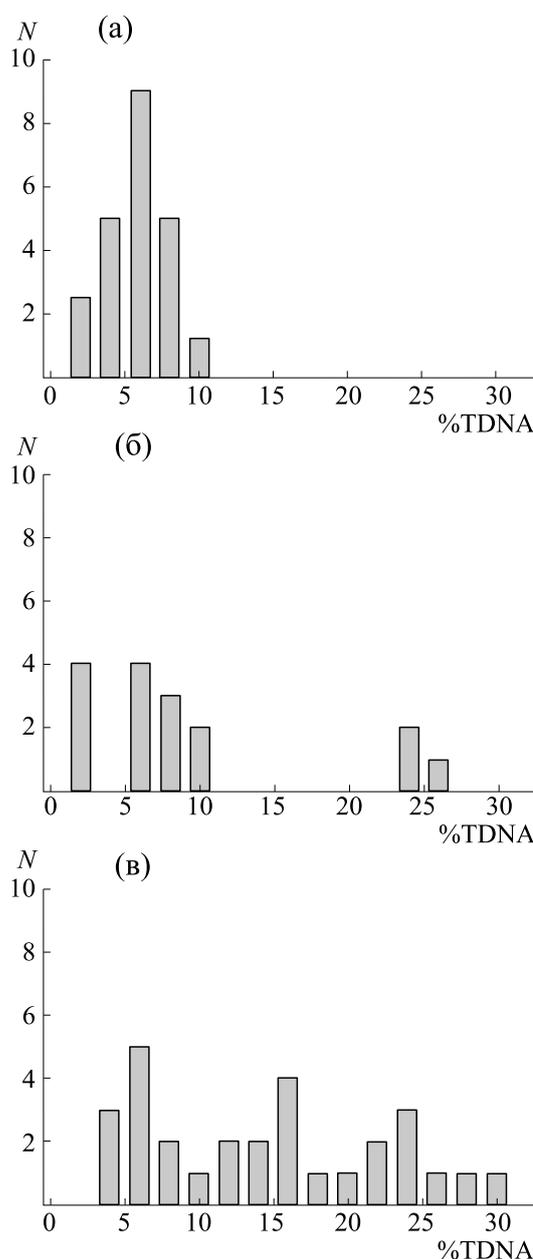
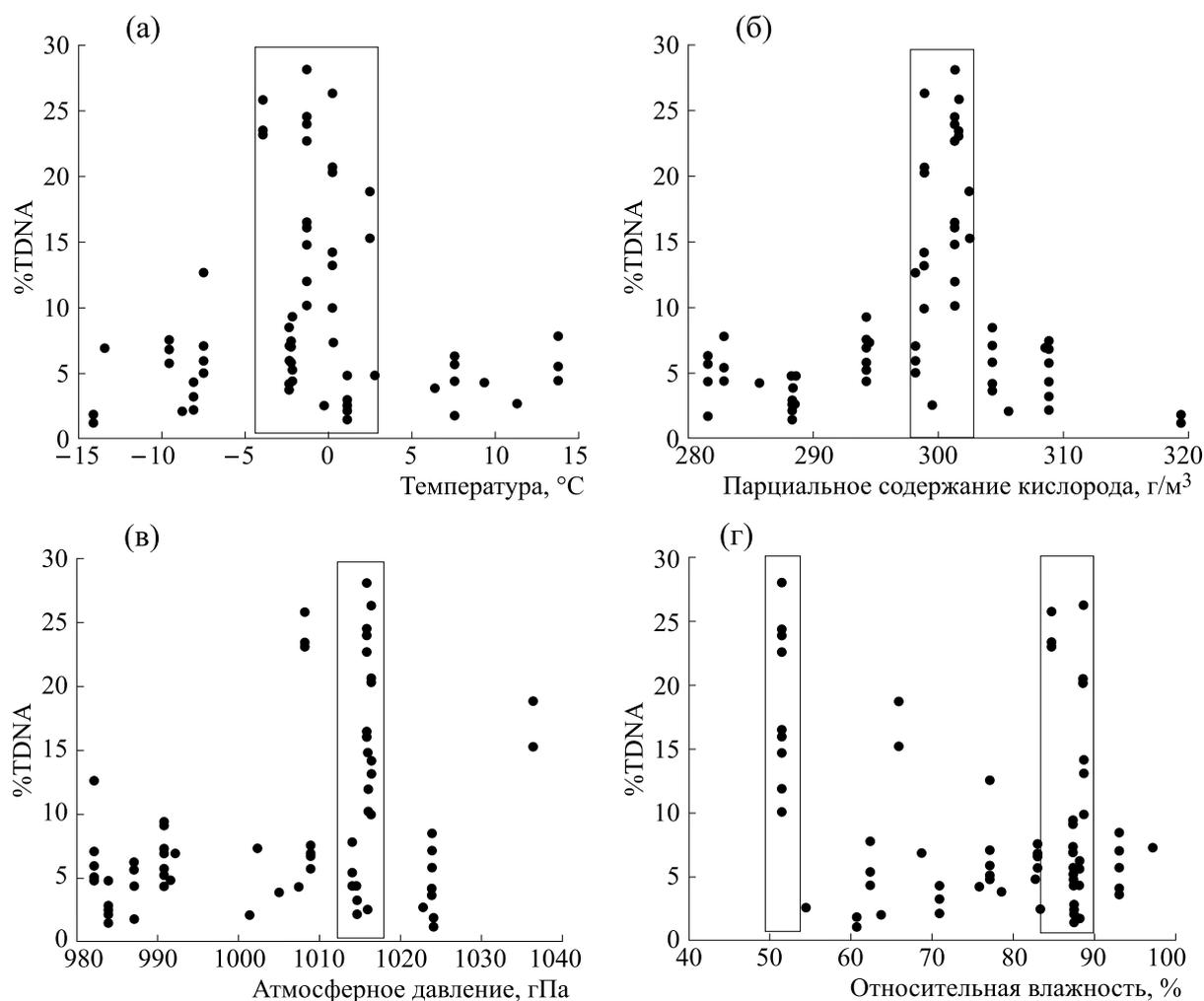


Рис. 2. Распределения выборочных значений %TDNA лейкоцитов крови интактных мышей в различные сезоны года: (а) – сентябрь–декабрь, (б) – февраль, (в) – март.

вреждений ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных в дозе 4 Гр и необлученных клеток. Видно, что изменения %TDNA ассоциированы с изменениями температуры воздуха. Выявлена статистически значимая корреляция между температурой воздуха и уровнями повреждений ДНК интактных ( $r_s = -0,883, p < 0,05$ ) и облученных ( $r_s = -0,847, p < 0,05$ ) клеток, а также температурой воздуха и разницей



**Рис. 3.** Распределение значений %TDNA лейкоцитов крови интактных мышей по синхронным значениям температуры воздуха (а), парциального содержания кислорода (б), атмосферного давления (в) и относительной влажности воздуха (г).

%TDNA между облученными и необлученными клетками ( $r_s = 0,739$ ,  $p < 0,1$ ). На рис. 8 указаны значения объясненной дисперсии  $R^2$  при аппроксимации зависимостей полиномом второй степени, что свидетельствует о зависимости %TDNA от температуры воздуха как интактных, так и облученных клеток.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Изучая влияние природных факторов – атмосферных и геомагнитных – на мышей, содержащихся в виварии, следует отметить, что из-за постоянной вентиляции в помещениях вивария идет активный обмен воздуха с внешней средой. То есть на животных оказывали влияние такие факторы как состав и влажность воздуха улицы, магнитное поле, атмосферное давление. Как было показано ранее, наличие здания не изменяло

спектрально-временную картину вариаций магнитного поля и атмосферного давления [12].

Вначале мы сопоставляли изменения %TDNA лейкоцитов крови с изменениями атмосферных факторов у интактных мышей. В предыдущих и настоящих исследованиях в наших условиях эксперимента в большинстве случаев значения %TDNA лейкоцитов не превышали 10% как у мышей, так и у человека [13], поэтому все значения %TDNA, равные или ниже 10%, считали фоновыми/базальными (рис. 1). Было обнаружено, что не наблюдается какой-либо зависимости %TDNA лейкоцитов мышей от влажности воздуха и атмосферного давления (рис. 3). Все повышенные относительно фона значения %TDNA располагались в окрестности нуля температуры ( $-4^{\circ}\text{C} - +3^{\circ}\text{C}$ ), то есть в интервале температур, при которых происходят фазовые переходы воды. Ранее высказывалась гипотеза о существовании

механохимических реакций радикальной диссоциации воды: в отличие от фотолиза или радиоллиза воды диссоциация воды предполагалась возможной и в случаях, когда плотность энергии активации заведомо меньше необходимой для диссоциации отдельных молекул воды [14]. Как считают авторы, появление  $H_2O_2$  при фазовых превращениях воды («вода—лед—вода» и «вода—пар—вода») можно объяснить именно механохимическими реакциями радикальной диссоциации воды, что также было подтверждено ими экспериментально. Было показано, что подобно тому, как это происходит при расплавлении и отвердевании полимеров, после фазовых переходов и в талой, и в конденсированной воде образуются  $OH$ -радикалы и  $H$ -атомы и накапливается  $H_2O_2$ . Это осуществляется и в отсутствие воздействия света. В экспериментах содержание  $H_2O_2$  в талой воде еще некоторое время после таяния монотонно увеличивалось, достигая насыщения через несколько часов, что свидетельствовало о значительной продолжительности жизни радикалов воды в клетках структур воды — кластерах. Существование кластеров водяного пара в атмосфере не вызывает сомнений, имеются предположения, что именно атмосферные кластеры воды способствуют перемещению веществ, переносимых парами воды из водных растворов [14]. Возможно, обнаруженное нами повышение значений %TDNA лейкоцитов связано с воздействием на них АФК, формирующихся при фазовых переходах воды в окружающей среде: АФК при активной вентиляции проникали в помещения вивария и посредством газообмена в легких могли воздействовать на клетки крови мышей. При среднесуточных температурах воздуха, находящихся в узком диапазоне  $-4^{\circ}C$ — $+3^{\circ}C$ , у одной части животных %TDNA лейкоцитов находился в пределах нормы, тогда как у другой части наблюдались существенно более высокие %TDNA. Обнаружено, что дням, в которые регистрировали максимальные значения %TDNA, предшествовало от 5 до 10 дней, когда среднесуточные температуры воздуха находились в интервале  $-4^{\circ}C$ — $+3^{\circ}C$ , то есть высокие уровни повреждений ДНК лейкоцитов у мышей наблюдались в тех случаях, когда формирующиеся в окружающей среде повышенные уровни АФК воздействовали на животных в течение некоторого времени. Выявляемые щелочной версией метода «комета-теста» ( $pH > 13$ ) повреждения ДНК обусловлены либо уже существующими разрывами ДНК, либо реализованными в разрывы щелочелabileными (апуриновыми/апиримидиновыми) сайтами: известно, что в щелочных условиях эти сайты превращаются в разрывы ДНК [7,15,16]. Поэтому и регистрируемые нами повышенные уровни повреждений ДНК лейкоцитов мышей могут быть обусловлены как разрывами, так и апуриновы-

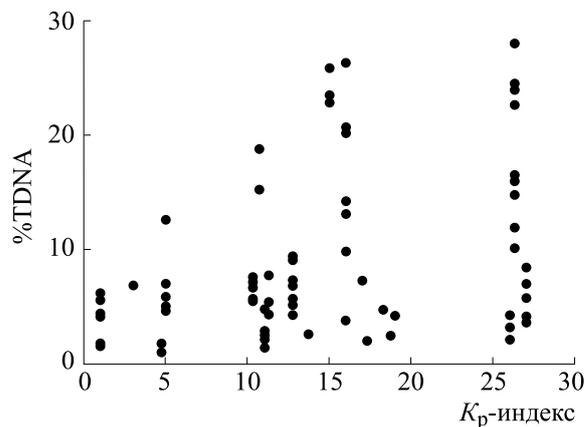
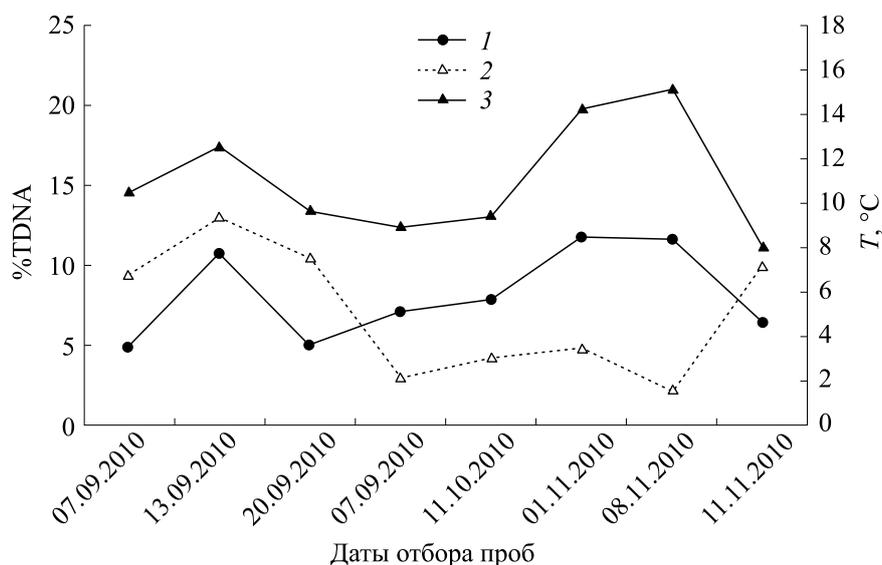


Рис. 4. Распределение значений параметра %TDNA лейкоцитов крови интактных мышей по синхронным значениям уровня геомагнитной активности.

ми/апиримидиновыми или содержащими модифицированные основания сайтами ДНК. Следует отметить, что все повышенные относительно фона %TDNA располагались также в узком диапазоне значений парциального содержания кислорода (298–304 мг/л, рис. 3). По-видимому, уровень  $H_2O_2$ , сформировавшийся в окружающей среде при атмосферных температурах, при которых происходят фазовые переходы воды, соотносился с определенными концентрациями кислорода в воздухе, тем более что расчетное значение парциального содержания кислорода в наибольшей степени зависело от соответствующей ему температуры воздуха, как видно из формулы (1).

Вариации %TDNA наблюдались и при изменении ГМА: при низком уровне ГМА высоких значений %TDNA не наблюдалось, а по мере роста уровня ГМА увеличивался и диапазон разброса значений %TDNA (рис. 4). Однако высокие значения %TDNA наблюдались и в дни с низким уровнем ГМА ( $K_p$ -индекс  $< 20$ ). Если весь массив данных разбить по месяцам проведения наблюдений, то наибольший разброс значений %TDNA приходился на март (рис. 2). В Московской области в этот период температура воздуха часто находилась в границах, соответствующих фазовым переходам воды. Исходя из представленного, можно полагать, что повышение уровня повреждений ДНК в основном связано с увеличением уровня АФК в воздухе, опосредованного изменениями температуры окружающей среды.

Чтобы выяснить, как изменяются уровни повреждений ДНК лейкоцитов при дополнительном воздействии на них АФК, следующие эксперименты были проведены в течение октября-ноября на пробах крови, полученных от одной мыши в разные дни, поскольку исследование на клетках одного и того же животного позволяет из-



**Рис. 5.** Изменения %TDNA лейкоцитов периферической крови мыши и среднесуточной температуры воздуха в дни отбора проб крови. Уровень поврежденных ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных и необлученных лейкоцитов крови: 1 – денатурация при 4°C; 2 – денатурация при 20°C; 3 – температура воздуха, °C.

бежать индивидуальных различий, обычно наблюдаемых в группе животных. Обнаружили, что при одной и той же дозе облучения (4 Гр) в условиях денатурации при 20°C наблюдался более высокий уровень поврежденных ДНК, чем при 4°C (рис. 5), что согласуется с литературными данными [17]. Поскольку процесс реализации щелочеллабильных сайтов в разрывы ДНК зависит от температуры [15], то очевидно, что при 20°C дополнительно выявлялись щелочеллабильные сайты, не реализовавшиеся в разрывы при 4°C. Уровни поврежденных ДНК для необлученных клеток статистически не различались при разных температурах денатурации ДНК, что позволяет считать, что регистрируемые при 20°C щелочеллабильные сайты возникли в ДНК в результате воздействия ионизирующей радиации, и эти сайты выявляются при более высокой температуре обработки. Индуцированные облучением изменения %TDNA были ассоциированы с изменениями температуры воздуха; вариации %TDNA по-разному соотносились с температурой: в интервале выше (данные, полученные в период 07.09.2010 – 05.10.2010) и примерно равными или ниже +4°C (данные, полученные в период 05.10.2010 – 11.11.2010) (рис. 5). С понижением температуры воздуха до +4°C наблюдалось увеличение %TDNA при обеих температурах денатурации, хотя корреляции между значениями %TDNA и среднесуточными температурами выявлено не было. Из представленного материала видно, что изменения индуцированных облучением уровней поврежденных ДНК лейкоцитов мышей соотносились с изменениями температуры воздуха.

Поскольку лейкоциты крови представлены в подавляющем большинстве зрелыми неделяющимися клетками, то следующие эксперименты были проведены на делящихся мышинных клетках лимфолейкоза Р388 и клетках АКЭ. Так, например, на седьмые сутки после перевивки клетки АКЭ различались по стадиям клеточного цикла следующим образом: количество клеток в стадии SubG0 в контроле колебалось в пределах 7% от общего числа клеток; в фазе G0/G1 регистрировалось примерно 62% клеток, тогда как в фазах S и G2/M – по 15% и 16% соответственно [18]. В наших экспериментах была обнаружена статистически значимая корреляция %TDNA необлученных клеток АКЭ с синхронными значениями атмосферной температуры воздуха ( $r_s = 0,577$ ,  $p < 0,05$ ). Индуцированные облучением изменения %TDNA у этих клеток, так же как и у лейкоцитов мышей, были ассоциированы с изменениями среднесуточной температуры, хотя корреляция между значениями %TDNA и температурой воздуха выявлена не было (рис. 6). При понижении температуры воздуха у облученных клеток наблюдалось увеличение %TDNA. При этом изменения температуры воздуха несколько опережали изменения %TDNA. Похожие изменения %TDNA наблюдались и для клеток Р388 (рис. 7, 8). Однако, в отличие от клеток АКЭ, у клеток Р388 была выявлена статистически значимая корреляция между температурой воздуха и %TDNA не только у необлученных ( $r_s = -0,883$ ,  $p < 0,05$ ), но и у облученных ( $r_s = -0,847$ ,  $p < 0,05$ ) клеток, а также между температурой и разностью значений %TDNA между облученными и необлученными

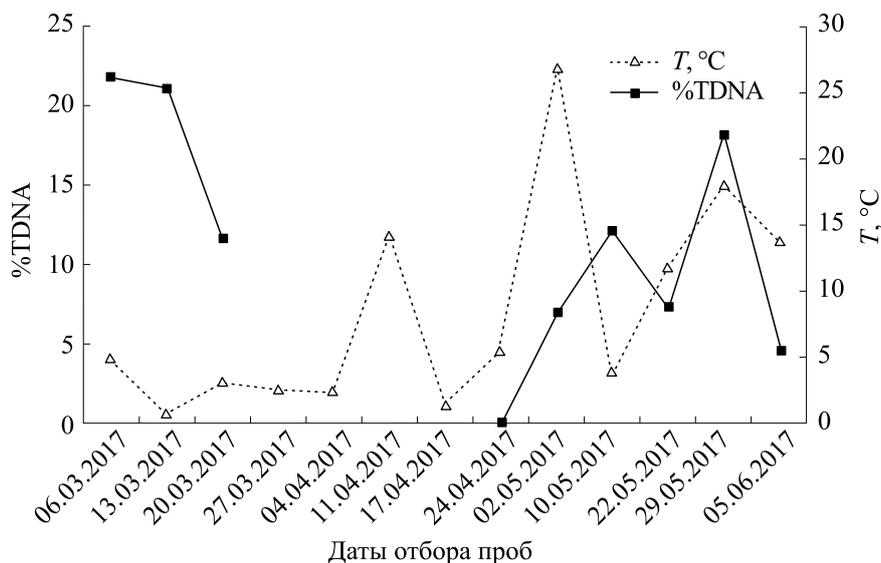


Рис. 6. Изменения %TDNA клеток АКЭ и среднесуточной температуры воздуха в дни отбора асцита. Уровень повреждений ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных и необлученных клеток АКЭ.

клетками ( $r_s = 0,739, p < 0,1$ ). Здесь необходимо подчеркнуть, что эксперименты с клетками P388 были проведены в дни, когда температура воздуха находилась в интервале  $-4^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$ , по сравнению с клетками АКЭ, когда наблюдались и более высокие атмосферные температуры. Кривая изменений %TDNA у облученных клеток P388 более точно соответствовала изменениям температуры воздуха по сравнению с клетками АКЭ, что, возможно, обусловлено также и различиями клеточных популяций: клетки P388 представлены двумя типами клеток [19], в то время как клетки АКЭ представляют собой в высшей степени дифференцированные элементы довольно разнообразной величины [20]. Некоторые авторы выделяют не менее трех субпопуляций АКЭ [18]. Как соотносятся по радиочувствительности разные субклеточные популяции у изучаемых опухолевых клеток – неизвестно. По сравнению с этими опухолевыми клетками лейкоциты мыши, которые в большинстве своем являются лимфоцитами, в свою очередь представлены в виде трех различных по радиочувствительности субпопуляций с  $D_{0(1)} = 0,36$  Гр,  $D_{0(2)} = 0,74$  Гр и  $D_{0(3)} = 4,37$  Гр; на радиорезистентную фракцию ( $D_0 = 4,37$  Гр) приходится примерно 30% клеток [21]. Таким образом, во всех случаях изучаемые клетки были представлены в той или иной степени гетерогенными популяциями. Тем не менее видно, что вариации %TDNA интактных или облученных опухолевых клеток АКЭ и P388, так же как и у лейкоцитов, ассоциированы с изменениями температуры воздуха. Сравнивая зависимости %TDNA интактных и облученных клеток от вариаций температуры, можно видеть, что эта зависи-

мость становится более выраженной, когда на клетки оказывают дополнительное воздействие АФК. Несмотря на то что повышенные уровни повреждений ДНК клеток ассоциированы также с определенным количеством кислорода в воздухе и высоким уровнем ГМА, температура воздуха, являющаяся результирующим показателем целого ряда атмосферных явлений, по всей видимо-

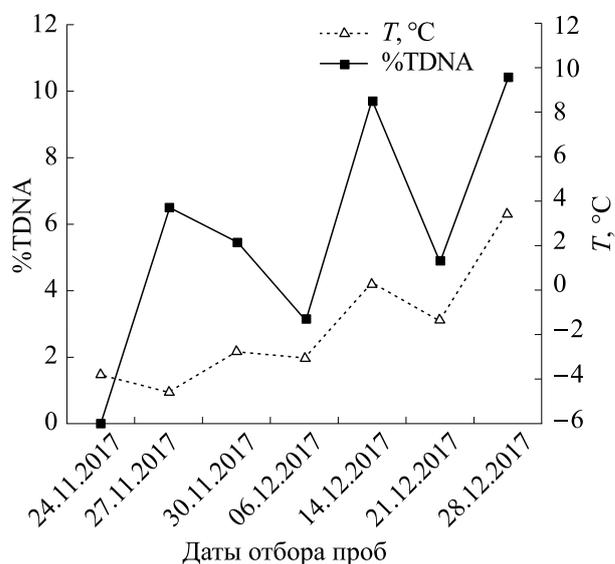
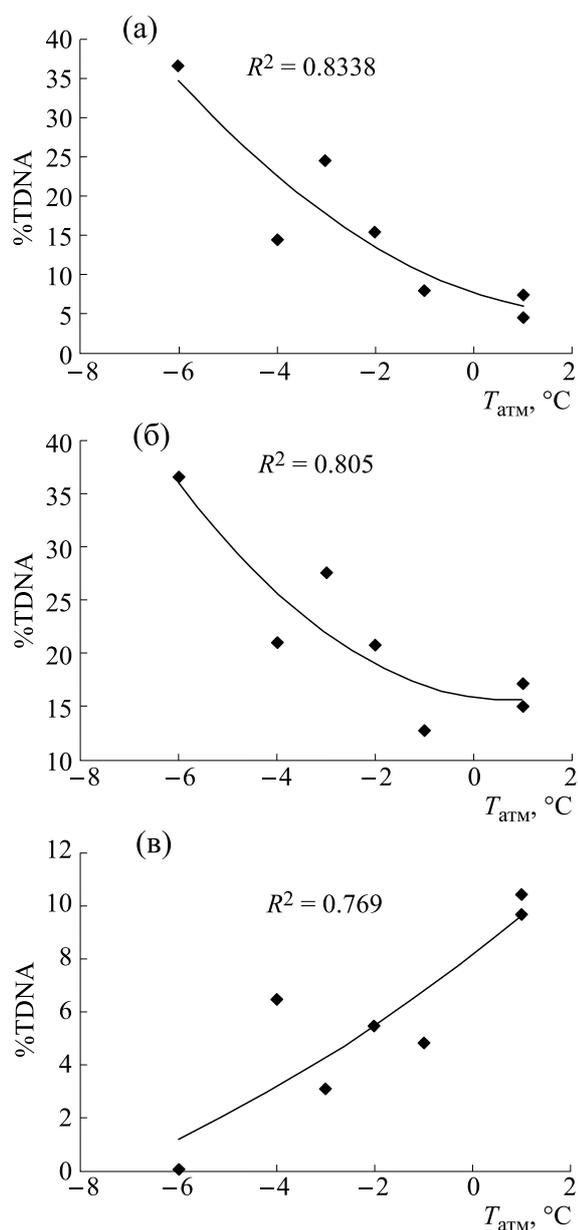


Рис. 7. Изменения %TDNA клеток лимфолейкоза P388 и среднесуточной температуры воздуха в дни отбора асцита. Уровень повреждений ДНК представлен как разность средних значений %TDNA облученных и необлученных клеток АКЭ.



**Рис. 8.** Зависимость между атмосферной температурой воздуха и уровнями повреждений ДНК интактных (а) и облученных (б) клеток лимфолейкоза мыши Р388, а также их разности (в). Указаны значения объясненной дисперсии  $R^2$  при аппроксимации зависимостей полиномом второй степени.

сти, может служить удобным параметром. Регистрируя изменения температуры, по-видимому, можно прогнозировать реакцию живых клеток на воздействие генотоксических факторов по критерию уровня повреждений ДНК этих клеток, однако здесь необходимы дополнительные эксперименты.

Таким образом, можно полагать, что вариации %TDNA у интактных лейкоцитов или опухолевых

клеток мышей ассоциированы с изменениями температуры воздуха, что, по-видимому, обусловлено воздействием активных форм кислорода, формирующихся в диапазоне температур  $-4^{\circ}\text{C}$ – $+3^{\circ}\text{C}$  в окружающей среде. Дополнительное воздействие АФК увеличивало %TDNA этих клеток, и индуцированные облучением уровни повреждений ДНК также были ассоциированы с изменениями температуры воздуха. Изменения базального уровня повреждений ДНК в этих клетках, по-видимому, могут приводить к изменению их радиационного ответа.

Авторы выражают искреннюю благодарность А.И. Газиеву, И.Ю. Митрошиной и М.Г. Ломаевой за помощь в проведении некоторых экспериментов, а также С.П. Романченко (лаборатория клеточной инженерии ИТЭБ РАН, руководитель группы цитогенетических исследований – С.И. Заичкина) за предоставление клеток асцитной карциномы Эрлиха и В.В. Шапошниковой (лаборатория окислительного стресса ИТЭБ РАН, руководитель – Ю.Н. Корыстов) за предоставление инокулята клеток мышинового лимфолейкоза Р388.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-01007 «офи\_м»).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. А. Зенченко, Дис. ... д-ра биол. наук (ИТЭБ РАН, Пушкино, 2016).
2. Т. А. Зенченко, А. Н. Скавуляк, Н. И. Хорсева и др., Геофизические процессы и биосфера **12** (1), 22 (2013).
3. Т. А. Зенченко и Н. Г. Варламова, Геофизические процессы и биосфера **14** (2), 50 (2015).
4. А. Л. Марков, Т. А. Зенченко, Ю. Г. Солонин и др., Авиакосмич. и экологич. медицина **47** (2), 29 (2013).
5. А. И. Газиев, Радиационная биология. Радиоэкология **39** (6), 630 (1999).
6. E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett.* **327**, 48 (2012).
7. A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, et al., *Mutagenesis* **23** (3), 143 (2008).
8. Д. А. Мошков, С. П. Романченко, Е. Ю. Парнышкова и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **154** (11), 646 (2012).
9. Е. В. Инжеваткин, *Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха* (Красноярский гос. ун-т, Красноярск, 2004).
10. N. K. Chemeris, A. V. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558**, 27 (2004).
11. D. P. Lovell and T. Omori, *Mutagenesis* **23** (3), 171 (2008).
12. П. М. Нагорский, Т. А. Зенченко, К. Н. Пустовалов и др., Вестн. КРАУНЦ. Физ.-мат. науки **4** (20), 64 (2017).

13. N. Sirota, E. Kuznetsova, and I. Mitroshina, *Radiat. Environ. Biophys.* **57** (2) 115 (2018).
14. Г. А. Домрачев, Д. А. Селивановский, П. А. Стунжас и др. *Эффективность образования пероксида водорода и радикалов воды в природе*, Препринт ИПФ РАН № 537 (Нижний Новгород, 2000) (<http://mognovse.ru/nzx-effektivnoste-obrazovaniya-peroksida-vodoroda-i-radikalov.html>, <http://pandia.ru/text/80/052/50489.php>).
15. M. V. M. Lafleur, J. Woldhuis, and H. Loman, *Int. J. Radiat. Biol.* **39** (2), 113 (1981).
16. M. V. M. Lafleur, J. Woldhuis, and H. Loman, *Nucl. Acids Res.* **9** (23), 6591 (1981).
17. G. Speit, K. Trenz, et al., *Toxicol. Lett.* **110**, **73** (1999).
18. Е. С. Менчинская, Дис. ... канд. биол. наук (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, 2014).
19. [http://www.bionco.ru/methods/exp\\_chemotherapy/strains/char\\_strains/P388](http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/P388).
20. Модели и методы экспериментальной онкологии, под ред. А. Д. Тимофеевского (Медгиз, М., 1960) (<http://wincancer.ru/onkologiya/strana.html>).
21. Л. А. Суворова и Л. Ю. Нугис, *Мед. радиология и радиац. безопасность* **57** (1), 30 (2012).

## Changes in the Level of DNA Damage in Mouse Cells as Induced by Atmospheric Factors

**Е.А. Kuznetsova\*, N.P. Sirota\*, and T.A. Zenchenko\* \*\***

*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

*\*\*Institute of Space Research, Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya ul. 84/32, Moscow, 117997 Russia*

Changes in the level of DNA damage as induced by atmospheric factors were studied according to the percentage of DNA in the tail (%TDNA) using the comet assay in blood leukocytes, Ehrlich ascites carcinoma and lympholeukosis P388 murine cells. It was shown that: (1) high values of DNA damage of blood leukocytes (%TDNA) are recorded within narrow ranges of atmospheric temperature (from  $-4^{\circ}\text{C}$  to  $+3^{\circ}\text{C}$ ) and partial ambient oxygen level of 298–304 mg/l; (2) the range of variations in %TDNA of leukocytes increases with increasing geomagnetic activity; (3) the changes in %TDNA of intact and irradiated (4 Gy) leukocytes and of tumor cells are associated with changes in air temperature; and (4) there is a correlation between temperature and %TDNA in both types of intact tumor cells and irradiated P388 cells. Thus, variations in %TDNA are apparently due to the effect of environmental reactive oxygen species generated at temperatures of phase transitions of water. Presumably, changes in the basal %TDNA of cells may lead to changes in their radiation response.

*Keywords: comet assay, murine blood, Ehrlich ascites carcinoma cells, lympholeukosis P388 cells, x-ray, air temperature*