

РАЗРАБОТКА НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ОБЛУЧЕНИЯ

И.Б. Моссэ¹, Л.П. Жаворонков², В.П. Молофей¹, О.С. Измestьева²,
В.М. Посадская², В.И. Измestьев²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь, e-mail: I.Mosse@igc.bas-net.by; ² Медицинский радиологический научный центр РАМН, 249020, Обнинск, Россия, e-mail: leonid.petrovich@inbox.ru

Ранее мы показали, что меланин способен снижать мутагенное действие хронического облучения, причем его радиозащитная эффективность при хроническом облучении еще выше, чем при остром. Известно, что меланин является очень активным акцептором и донором электронов и обладает высокой антирадикальной активностью. Поэтому чем ниже мощность дозы, тем выше возможность для меланина осуществлять свое протекторное действие. Для того чтобы проверить влияние меланина на мутагенное действие малых доз радиации, мы использовали явление радиоадаптивного ответа. При введении меланина за 2 часа до адаптирующей дозы адаптивный ответ не проявлялся. Если же меланин вводили между адаптирующей и повреждающей дозами, то наблюдался и защитный эффект меланина, и радиоадаптивная реакция, в результате чего частота мутаций снижалась практически до контрольного уровня. Таким образом, выявлена способность меланина полностью предотвращать повреждающее действие малых доз ионизирующей радиации. Показано также, что ежедневное пероральное введение меланина в дозе 10 мг/кг веса беременным самкам крыс устраняло функциональный дефицит физического и психоэмоционального развития, выявляемый у потомства при антенатальном γ -облучении. На основании полученных данных делается заключение о радиопротекторном действии меланина в отношении цитогенетических и эмбриотоксических эффектов малых доз ионизирующей радиации.

Введение

Загрязнение биосферы радионуклидами, а также непрерывное расширение применения ионизирующих излучений в различных областях науки и техники, сельского хозяйства и медицины делают неизбежным облучение значительных групп людей. В связи с развитием космических исследований возникла опасность облучения космонавтов космическими лучами.

Повышение уровня радиоактивного фона в районах, пострадавших от загрязнения радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС, привело к реальной необходимости широкого использования в повседневной жизни радиопротекторов.

В результате полувекового опыта поиска средств химической защиты от поражающего

действия ионизирующей радиации синтезированы многие тысячи препаратов, защищающих организм от острого лучевого поражения (Кудряшов, 1997). Однако из огромного числа радиопротекторов пригодными для человека оказались лишь несколько препаратов, снижающих эффекты от облучения в высоких дозах и, как правило, неэффективных при низкоинтенсивном воздействии.

Реальная ситуация, сложившаяся в радиационно неблагоприятных районах, требует разработки новых путей химической защиты от радиации низкой интенсивности. Доказано, что малые дозы радиации, не оказывающие заметного физиологического влияния на организм, повышают частоту генетических нарушений (мутаций) в облученных клетках. Традиционные препараты, обладающие кратковременным действием и высокой токсично-

стью, оказываются непригодными при хроническом облучении (Кудряшов, 1997, 1998).

Кроме того, роль естественного отбора в современном человеческом обществе резко снижена, поэтому возрастание уровня мутаций, вызываемое длительным облучением, приводит к «отягощённости» популяций человека «генетическим грузом». В то же время при использовании наиболее эффективных радиопротекторов с целью уменьшения мутагенного действия облучения было показано, что они либо вовсе не способны защищать наследственные структуры, либо оказываются менее эффективными, чем при защите от лучевой гибели. Ни один из традиционных радиопротекторов не способен уменьшать частоту мутаций, накапливающихся в виде «генетического груза» в популяциях, и не эффективен при хроническом действии ионизирующей радиации. Все это свидетельствует о необходимости поиска иных путей защиты наследственности от мутагенных эффектов облучения (особенно хронического).

Несмотря на особую сложность этой проблемы, нами были получены обнадеживающие результаты, приведшие впоследствии к разработке генопротектора нового типа, способного защищать не только от острого, но и от хронического облучения (Mosse *et al.*, 1999). Такими уникальными способностями, как оказалось, обладает пигмент меланин, созданный самой природой для защиты от ультрафиолетового облучения.

Меланин не токсичен, содержится в тканях микроорганизмов, растений, животных и человека (придает окраску волосам, ресницам, радужной оболочке глаза, коже), в ряде пищевых продуктов (чае, кофе, какао, шоколаде, грибах, черном винограде, красном вине и т. д.). Поскольку меланин защищает организм от ультрафиолетового облучения, он образуется в клетках кожи человека под воздействием солнечных лучей, создавая «загар». В мировой литературе были некоторые сведения о способности этого пигмента уменьшать летальное действие ионизирующей радиации, но влияние меланина на генетические эффекты облучения изучено нами впервые.

Были проведены исследования на разных биологических объектах – животных (дрозофила, мыши, крысы) и культивируемых клетках человека. Показано, что пигмент мела-

нин обладает высокой генопротекторной активностью при остром воздействии ионизирующей радиации в широком интервале доз. При этом было установлено, что меланин эффективно снижает частоту индуцированных ионизирующей радиацией мутаций как в соматических, так и в зародышевых клетках (Mosse *et al.*, 2002).

Уникальной является способность меланина уменьшать почти до контрольного уровня частоту генетических повреждений, передающихся из поколения в поколение и накапливающихся в популяциях в виде «генетического груза» (Mosse, Lyach, 1994). Впервые показана принципиальная возможность эффективной защиты популяций животных при облучении в течение многих поколений с помощью меланина (на дрозофиле исследовано 150 поколений, на мышах 5) (Моссэ, 1996).

Интересно, что радиозащитная эффективность меланина оказалась более высокой при хроническом облучении, чем при остром (Mosse *et al.*, 1999). Известно, что меланин является очень активным акцептором и донором электронов и обладает высокой антирадикальной активностью. Поэтому чем ниже мощность дозы или меньше доза облучения, тем выше возможность для меланина осуществлять свое протекторное действие (Grossi *et al.*, 1998).

Обнаружение высокой эффективности меланина в защите от малых доз радиации и в уменьшении генетических последствий хронического облучения свидетельствует о перспективности использования меланина для защиты населения, проживающего в районах с повышенным радиационным фоном.

Для того чтобы проверить влияние меланина на мутагенное действие малых доз радиации, повреждающее действие которых в эксперименте не обнаруживается, мы использовали радиоадаптивный ответ.

Вместе с тем до сих пор не было создано и не известны попытки поиска приемлемых средств, способных реально ослабить эффекты внутриутробного низкоинтенсивного облучения и тем самым ограничить тератогенное действие радиационного загрязнения внешней среды (Гончаренко и др., 1997). Представляло интерес оценить возможность радиозащитного действия экзогенного меланина у животных, облученных в антенатальном периоде.

Изучение с помощью радиоадаптивного ответа влияния меланина на цитогенетические эффекты малых доз ионизирующей радиации

Материал и методика

Опыты проводились на белых мышах линии Af. Животные подвергались рентгеновскому облучению с мощностью дозы 5,57 сГр/мин. Величина дозы составляла 1,7 Гр. В вариантах с адаптивным ответом облучение проводилось сначала в адаптирующей дозе 0,2 Гр, а спустя 4 часа в выявляющей дозе 1,5 Гр. Меланин в концентрации 3 мг/кг вводился внутривентрально за два часа до облучения в повреждающей дозе. Забой мышей производился спустя сутки после облучения в повреждающей дозе. Проводили цитогенетический анализ частоты реципрокных транслокаций в половых клетках и выхода хромосомных aberrаций в клетках костного мозга стандартными методами. Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния меланина на адаптивный ответ показано, что внутривентральные инъекции меланина при однократном облучении 1,7 Гр снижают выход хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей в 1,5–2 раза и выход реципрокных транслокаций в сперматоцитах мышей – в 2 раза (табл. 1, рис.).

При сравнении генетической эффективности однократного воздействия в дозе 1,7 Гр и фракционированного (0,2 Гр + 1,5 Гр) был обнаружен адаптивный ответ как в соматиче-

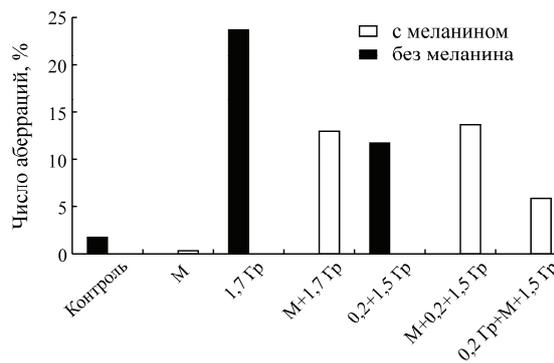


Рис. Влияние меланина на адаптивный ответ в клетках костного мозга мышей (М – меланин).

ских, так и в половых клетках – частота мутаций при дроблении дозы была ниже, чем при остром облучении в суммарной дозе.

Введение меланина за 2 часа до облучения оказывало одинаковый эффект как при однократном, так и при фракционированном облучении в обоих видах клеток. Было неясно, то ли меланин не снижает мутагенное действие фракционированного облучения, то ли в условиях защиты меланином адаптивный ответ не проявляется.

Чтобы выяснить причину наблюдаемых явлений, мы исследовали влияние меланина, введенного после адаптирующей дозы, за 2 часа до воздействия в основной дозе 1,5 Гр. В этом случае частота мутаций оказалась существенно ниже, чем в предыдущих вариантах (табл. 1, рис.), что можно объяснить суммированием эффектов адаптивного ответа и протекторного действия меланина. В половых клетках в варианте «0,2 Гр + меланин + 1,5 Гр» частота мутаций снизилась почти до спонтанного уровня. Из полученных данных можно сделать вывод, что меланин, введенный перед адаптирующей дозой,

Таблица 1

Влияние меланина на адаптивный ответ в половых клетках (сперматоцитах) мышей

Варианты воздействия	Количество мышей	Количество клеток	Аберрации, %
1,7 Гр	10	1872	1,44 ± 0,26
0,2 Гр + 1,5 Гр	8	1331	0,83 ± 0,25
М + 1,7 Гр	10	1587	0,63 ± 0,20
М + 0,2 Гр + 1,5 Гр	6	947	0,63 ± 0,26
0,2 Гр + М + 1,5 Гр	8	445	0,45 ± 0,32

М – меланин.

полностью снимает её эффект и поэтому реакция адаптивного ответа не проявляется.

Известно, что адаптивный ответ связан со стимуляцией репарационных процессов в клетке малой (адаптирующей) дозой. При этом действие повреждающей дозы приходится на состояние повышенной радиорезистентности клетки. Выступая в роли буфера, меланин снимает действие малой дозы радиации, предотвращая адаптивный ответ.

Таким образом, показано, что меланин способен полностью устранять биологическое действие малых доз ионизирующей радиации (в частности 0,2 Гр).

Экспериментальная оценка противолучевых свойств меланина при антенатальном облучении

Материалы и методы

Опыты поставлены на крысах линии Вистар. 100 половозрелых самок (возраст 3,5 мес., масса тела 230 ± 10 г) после верификации у них беременности по общепринятой методике (Конописцев, 1975) подвергали хроническому внешнему γ -облучению на установке «Эксперимент» (Россия): источник γ -излучения ГС 7,012 с изотопом цезия – 137, энергия 0,661 МэВ и активностью $5,2 \times 10^{11}$ Бк. Дозиметрические исследования и доверительную границу погрешности величины дозы определяли непосредственно в каждой клетке, куда на время облучения размещали животных. Мощность поглощенной дозы в прямом пучке составила $2,6 \pm 0,2$ мГр/ч при $0,06 \pm 0,005$ мГр/ч в зоне минимальных значений (ложное облучение). Облучение или ложное облучение проводили круглосуточно в течение всего срока беременности (20 суток) с ежедневным перерывом на 30 мин для кормления животных и введения им препарата. Суммарная поглощенная доза в группе облучения составила $\approx 1,25$ Гр, а у ложного облучения (контроль) – 0,03 Гр. В течение всего эксперимента животных содержали в стандартных пластиковых клетках в условиях климатического комфорта ($t = 22$ °С, влажность воздуха 50 %). Меланин в виде суспензии на крахмальном геле вводили ежедневно из расчета 10 мг/кг внутрижелудочно, а контролю в качестве плацебо – 1 % крахмальный

гель. С учетом правил рандомизации были сформированы 4 экспериментальные группы крыс: ложное облучение; ложное облучение + меланин; γ -облучение; γ -облучение + меланин.

В данной работе представлены результаты комплексного исследования, позволяющие оценить течение и исход беременности, а также развитие потомства в пострadiационном периоде. С этой целью в конце беременности (на 21-е сутки) каждую подопытную группу животных методом случайного выбора разделяли на две подгруппы. Под нембуталовым наркозом (55 мг/кг внутривентриально) у части самок производили подсчет числа живых плодов и количества желтых тел в обоих яичниках. По разнице между этими показателями судили об уровне внутриутробной гибели. У остальных животных каждой группы оценивали прибавку массы тела за беременность, а также после родов – внепометные потери массы тела. На первые сутки после родов регистрировали число живых крысят по каждому помету всех экспериментальных групп. В последующем вели систематическое наблюдение за крысятами (240 особей), регистрируя ряд показателей, характеризующих соматическое развитие – динамику массы тела, параметры раннего онтогенеза – сроки покрытия шерстью, прорезывания зубов и прозревания. Для характеристики адаптивных возможностей организма использовали интегральный тест выносливости к физической динамической нагрузке по длительности принудительного бега в третбане в возрасте 40 дней.

В ювенильном возрастном периоде (40 дней), отличающемся максимальной двигательной активностью, у всех крысят оценивали психоэмоциональный статус по тесту спонтанной двигательной активности (СДА) в «открытом поле». При этом фиксировали время до начала проявления ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) при помещении животных в центр ярко освещенного поля размером $1,0 \times 1,0$ (лаг-фаза), количество стоек и число освоенных квадратов как центральной (4 квадрата), так и периферической (12 квадратов) зон.

Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что изолированное действие γ -облучения в указанной дозе, меланина и их сочетанное применение не оказывает влияния на течение и исход беременности по всем изученным параметрам: приросту массы тела за беременность, потери массы в родах, количеству желтых тел яичников и плодов, количеству крысят в помете.

Анализ соматического развития крысят в пострадиационном периоде, оцениваемого по динамике набора массы тела, также не выявил существенных отклонений от физиологической нормы. Так, за первые 14 дней по всем четырем экспериментальным группам отмечена синхронность в наборе массы тела животных. Более того, в первые трое суток раннего онтогенеза, когда происходит адаптация организма к новым условиям существования, нами не зарегистрировано случаев гибели животных. По срокам покрытия шерстью, прорезывания зубов и прозревания развитие крысят подопытных групп не отличалось от контрольной.

На 21-е сутки отмечена тенденция к превышению массы тела у крысят, подвергнутых сочетанному действию γ -облучения и меланина. Выявленные изменения носили транзиторный характер, и в остальные сроки наблюдения животные этой группы не отличались от контроля. Особого внимания заслуживает группа крысят-самок, антенатально получавших меланин, у которых отмечалось более ускоренное развитие, оцениваемое по приросту массы тела, в результате чего утроение массы тела происходило к двум месяцам жизни, тогда как у контрольных животных этот же результат достигался примерно к трем месяцам. Феномен ускоренного роста может быть объяснен тем фактом, что меланин способен влиять на обмен веществ, гормональную регуляцию, а также клеточную дифференцировку и, как следствие, оказывать влияние на рост и жизнеспособность животных (Моссэ, 1990).

Эмбриопротекторные свойства меланина оценивали и по физической работоспособности животных. Выносливость к физической нагрузке является тестом, интегрально характеризующим состояние ведущих функциональных систем организма, обеспечи-

вающих нервно-мышечную и вегетососудистую регуляцию, а также биохимические механизмы мышечной работы. В опытах на 98 животных установлено, что изолированное γ -облучение в суммарной дозе 1,25 Гр снижает среднюю по группе продолжительность бега. Изолированное действие меланина как и его сочетание с γ -облучением, статистически значимо увеличивает среднюю продолжительность бега животных (табл. 2). При этом происходит и существенное снижение доли крыс с выраженной физической астенией (бег менее 8 мин).

Таблица 2

Основные показатели принудительного бега крыс-самок в возрасте 40 дней, облученных в антенатальном периоде γ -квантами (1,25 Гр за 20 дней беременности) на фоне экзогенного меланина

Группы (по 25–30 животных)	Средняя по группе продолжительность бега (мин)	Доля крыс с физической астенией, %
Ложное облучение	13,1 ± 1,7	45
γ -облучение	8,4 ± 1,2*	60
Меланин	17,5 ± 1,9*	23,3**
Меланин + γ -обл.	17,4 ± 1,8**	28,6**

* Достоверные различия при сравнении с ложным облучением ($p < 0,05$); ** достоверные различия при сравнении с γ -облучением ($p < 0,05$).

Результаты оценки психоэмоционального состояния животных показали, что антенатальное воздействие как изолированного γ -облучения, так и на фоне меланина не приводило к существенному сдвигу в параметрах СДА самок Вистар при тестировании в возрасте 40 дней. У самцов в этом же возрастном периоде зарегистрировано повышение СДА в группах «меланин», а также «меланин + γ -облучение». Это выражается в достоверном по сравнению с контролем и γ -облучением увеличении числа стоек и числа пересечений границ квадратов, причем эти животные активно осваивают как периферическую, так и центральную зоны (табл. 3), что может свидетельствовать об антифобических наклонностях у этих животных. Количество стереотипий и актов дефекаций по всем экспериментальным группам не изменилось.

Таблица 3

Основные показатели спонтанной двигательной активности крысят-самцов в возрасте 40 дней после хронического γ -облучения (1,25 Гр за 20 дней *in utero*) на фоне экзогенного меланина

Группы	N	Количество вставаний	Заходы в углы	Число пересечений квадратов периферической зоны
Ложное облучение	28	14,3 ± 2,0	20,0 ± 2,3	57,7 ± 6,7
γ -облучение	28	12,6 ± 2,3	15,9 ± 2,5	45,4 ± 7,8
Меланин	30	20,9 ± 2,9	23,9 ± 2,2	71,3 ± 7,0
Меланин + γ -облучение	30	19,4 ± 2,5**	22,6 ± 2,2**	66,7 ± 6,7**

N – количество животных в группах; ** достоверные различия при сравнении с γ -облучением.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами выявлено определенное радиоэмбриопротекторное действие меланина в отношении эмбриотоксических эффектов малых доз ионизирующей радиации.

При антенатальном облучении животных в дозе 1,0 ÷ 1,25 Гр за весь период ежедневное пероральное введение меланина в дозе 10 мг/кг беременным самкам устраняло функциональный дефицит, выявленный у облученного потомства в постнатальном периоде, по выносливости к физической нагрузке и психоэмоциональной устойчивости животных.

Заключение

Исследовано влияние меланина на мутагенное действие малых доз радиации с помощью феномена радиоадаптивного ответа. При введении меланина за 2 часа до адаптирующей дозы адаптивный ответ не проявлялся. Если же меланин вводили между адаптирующей и повреждающей дозами, то наблюдался и защитный эффект меланина, и радиоадаптивная реакция, в результате чего частота мутаций снижалась практически до контрольного уровня. Показано также, что ежедневное пероральное введение меланина в дозе 10 мг/кг веса беременным самкам крыс устраняло функциональный дефицит физического и психоэмоционального развития, выявляемый у потомства при антенатальном γ -облучении в дозе 1,00–1,25 Гр за весь период беременности. На основании полученных данных делается заключение о радиопротекторном действии меланина в

отношении цитогенетических и эмбриотоксических эффектов малых доз ионизирующей радиации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ–РГНФ в рамках научно-исследовательского проекта «Разработка средств профилактики генетических и онтогенетических последствий острого и хронического облучения» № ГО5Р-016 (2005–2006 гг.).

Литература

- Гончаренко Е.Н., Деев Л.И., Кудряшов Ю.Б. и др. Использование препарата природного происхождения для ослабления биологических эффектов в условиях радиоактивного загрязнения и в радиобиологическом эксперименте // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 676–682.
- Конописцев Л.А. Датирование сроков беременности у крыс и влияние яйцеклеток на количество живых плодов // Онтогенез. 1975. Т. 6. Вып. 4. С. 411–413.
- Кудряшов Ю.Б. О химической защите от ионизирующей радиации низкой интенсивности // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 673–675.
- Кудряшов Ю.Б. Современные проблемы и перспективы противолучевой химической защиты организмов и биосистем // Тез. докл. Всероссийской конференции с международным участием «Проблемы противолучевой защиты». Москва, 1998. С. 5.
- Моссэ И.Б. Радиация и наследственность: Генетические аспекты противорадиационной защиты. Минск: Университетское изд-во, 1990. 208 с.

- Grossi G.F., Durante M., Gvalanella G., Pugliese M., Mosse I. Effects of melanin on high-LET radiation response of human epithelial cells // *Radiation and Environmental Biophysics*. 1998. V. 37. P. 63–67.
- Mosse I.B., Lyach I.P. Influence of melanin on mutation load in *Drosophila* population after long-term irradiation // *Radiation Res.* 1994. V. 139, N 3. P. 356–358.
- Mosse I., Plotnikova S., Kostrova L., Dubovic V., Molophei V. Melanin influence on chronic and fractionated irradiation in germ and somatic cells of mice / *Hungarian J. of Animal Production*. 1999. V. 48, N 1. P. 145–148.
- Mosse I., Dubovic B., Plotnikova S. *et al.* Melanin is effective radioprotector against chronic irradiation and low radiation doses // *IRPA. Regional Congress on Radiation Protection in Central Europe. Radiation Protection and Health, Proceedings. Dubrovnik, Croatia, May 20–25, 2001.* ISBN 2002. 30-06 P. 1–6.

Working out the mean of prophylaxis with melanin of genetic and ontogenetic after-effects of irradiation

**I.B. Mosse¹, L.P. Zhavoronkov², V.P. Molofei¹, O.S. Izmistieva²,
V.M. Posadskaya², V.I. Izmistiev²**

¹Institute Genetics and Cytology of NASB, 220072, Minsk, Belarus, e-mail: I.Mosse@igc.bas-net.by

²Medical Radiological Research Centre of Russian Academy of Medical Sciences, 249020, Obninsk, Russia, e-mail: leonid.petrovich@inbox.ru

Summary

Earlier we have shown that melanin is able to reduce mutagenic action of chronic irradiation and its radioprotective efficiency is even higher under chronic irradiation than under acute one. Melanin is known to be a very active acceptor and donor of electrons and exhibits high antiradical activity, therefore the lower the dose or dosage rate, the higher the possibility for melanin to realize its protector effect. On order to test the melanin effect on a mutagenic action of low radiation doses, we have used a radioadaptive response phenomenon. No adaptive response was observed by administrating melanin 2 hours before the adapting dose. If melanin was administrated between the adapting and damaging doses, both the protective effect of melanin and the radioadaptive response were observed, as a result of which the mutation frequency was reduced practically to the control level. It means that melanin is able to remove completely biological effect of low radiation doses. Daily peroral melanin administration at a dose of 10 mg/kg weight to pregnant rat females was shown to eliminate functional deficiency of physical and psychoemotional development revealed in the offspring under antenatal γ -irradiation at a dose of 1.00-1.25 Gy over gestation. Based on the data obtained, it is concluded about melanin radioprotector action with respect to cytogenetic and embryotoxic effects of ionizing radiation low doses.