



© В.Н. Анисимов, И.В. Мизгирев, А.В. Панченко, Ю.Д. Вон,
А.А. Осипов, Е.И. Федоров

Влияние полифенольной композиции ВР-С2 на скорость реверсии опухолей печени у трансгенного потомства облученных рыб *Danio rerio*

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

© Vladimir N. Anisimov, Igor V. Mizgirev, Andrey V. Panchenko, Yulia D. Von, Aleksei A. Osipov,
Elena I. Fedoros

Effect of Polyphenol Composition BP-C2 on the Rate of Liver Tumor Reversion of Transgenic Progeny of Irradiated Fish *Danio Rerio*

N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

Введение. Отдаленными последствиями использования радиотерапии или химиотерапии у онкологических пациентов могут быть вторые первичные опухоли, нарушения фертильности, а также негативное влияние на здоровье потомства. Поэтому поиск средств сопроводительной терапии, уменьшающих данные эффекты, является важным направлением экспериментальных исследований.

Цель. Изучение влияния полифенольной композиции ВР-С2 на скорость реверсии опухолей печени у трансгенного потомства рыб *Danio rerio*, полученного от облученных самцов.

Материалы и методы. Взрослые не трансгенные самцы рыб в возрасте 8 месяцев были облучены рентгеновскими лучами в дозе 5 Гр, после чего половина рыб содержалась в растворе ВР-С2 50 мг/л на протяжении 24 часов. Контрольную группу составили интактные рыбы. Через 85 дней от начала опыта самцы опытных и контрольной групп (F_0) были использованы для получения потомства (F_1) от самок трансгенной индуцибельной линии Tg (fabp10:TA; TRE:xmkr; krt4:GFP), развивающей обратимые гепатоцеллюлярные карциномы под воздействием доксициклина (DOX). Рыбы поколения F_1 в возрасте 6 месяцев обрабатывались DOX (60 мкг/мл) на протяжении 25 дней и через 10 дней после окончания экспозиции были подвергнуты эвтаназии с последующим гистологическим исследованием печени.

Результаты. Показано, что в процессе нормализации уровень гиперплазии печени у трансгенных рыб, оцениваемый по количеству ядер гепатоцитов на срезах, был существенно выше у потомства облученных рыб ($906,8 \pm 27,3$), чем у потомства контрольных ($691,6 \pm 34,1$, $p = 0,0003$) или самцов, получавших ВР-С2 после облучения ($761,3 \pm 27,4$, $p = 0,0069$).

Заключение. Композиция ВР-С2 способствовала нормализации скорости реверсии опухолей печени у трансгенного потомства облученных рыб, что позволяет рассматривать её как средство профилактики трансгенерационных последствий облучения.

Ключевые слова: *Danio rerio*; онкология; радиация; канцерогенез; ВР-С2; полифенолы

Introduction. Chemo- and radio- therapy in oncology patients may lead to late effects including development of second primary tumors, impairment of fertility, and negative effects on offspring health. Therefore, the unmet needs in concomitant therapy to reduce these effects requires further experimental research.

Aim. To study effects of polyphenolic composition BP-C2 on the rate of the liver tumor reversion in transgenic progeny of irradiated males of zebrafish *Danio rerio*.

Materials and Methods. Adult non-transgenic 8-month-old male fish were irradiated with 5 Gy X-ray. Then half of the fish was exposed to BP-C2 solution (50 mg/L for 24 h). Intact fish were used as control. 85 days after irradiation male fish (F_0) of irradiated and control groups were crossed with heterozygous transgenic Tg (fabp10:TA; TRE:xmkr; krt4:GFP) female fish to produce F_1 progeny. This transgenic fish are able to develop reversible hepatocellular carcinomas under doxycycline (DOX) treatment. Six-month-old F_1 fish were exposed to DOX (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 25 days and after 10-day recovery in clean water were euthanized for histopathological liver examination.

Results. The number of hepatocyte nuclei per tissue sections was used as marker for liver hyperplasia. As a result, hepatocyte nuclei count was significantly higher in the progeny of the irradiated fish ($906,8 \pm 27,3$), than in the progeny of the control male fish ($691,6 \pm 34,1$, $p = 0,0003$) or of males treated with BP-C2 post-irradiation ($761,3 \pm 27,4$, $p = 0,0069$).

Conclusion. BP-C2 composition facilitated of normalization of liver tumors reversion rate in transgenic progeny of irradiated fish. It could be considered as a promising approach for prevention of transgenerational effects of irradiation.

Keywords: *Danio rerio*; oncology; radiation; carcinogenesis; BP-C2; polyphenols

Для цитирования: Анисимов В.Н., Мизгирев И.В., Панченко А.В., Вон Ю.Д., Осипов А.А., Федорос Е.И. Влияние полифенольной композиции ВР-С2 на скорость реверсии опухолей печени у трансгенного потомства облученных рыб *Danio rerio*. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(2): 278-285.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-278-285

For Citation: Vladimir N. Anisimov, Igor V. Mizgirev, Andrey V. Panchenko, Yulia D. Von, Aleksei A. Osipov, Elena I. Fedoros. Effect of polyphenol composition ВР-С2 on the rate of liver tumor reversion of transgenic progeny of irradiated fish *Danio rerio*. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(2): 278-285. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-278-285

✉ Контакты: Федорос Елена Ивановна, elenafedoros@gmail.com

Введение

Химио- и лучевая терапия успешно используются в современной онкологии для лечения злокачественных новообразований, в ряде случаев обеспечивая полную пожизненную ремиссию. В то же время применение лучевой терапии и алкилирующих препаратов, обладающих потенциальными канцерогенными эффектами, связывают с увеличением в 1,4–2,2 раза относительного риска развития у пациента второго первичного злокачественного новообразования [1–2]. В экспериментальных исследованиях показано, что ионизирующее излучение или использование химических генотоксикантов способствуют развитию нестабильности генома, увеличивая чувствительность организма к следующему канцерогенному воздействию; более того, такая повышенная чувствительность передается потомкам [3–5].

В качестве стратегии предотвращения описанных рисков можно рассматривать полное исключение этиологического фактора [6] или применение химиофилактических средств.

В данном исследовании в качестве потенциального химиофилактического средства использовалась новая полифенольная композиция, полученная из лигнина, с молибдатом аммония (ВР-С2). Ранее было показано, что ВР-С2 эффективно подавляет развитие опухолей легкого у потомков облученных мышей [7].

В качестве модельной системы использовались рыбы *Danio rerio*, которые находят широкое применение во многих областях биомедицинских исследований, включая оценку последствий воздействия ионизирующего излучения [8]. Цель исследования — изучение влияния полифенольной композиции ВР-С2 на скорость реверсии опухолей печени у трансгенного потомства рыб *Danio rerio*, полученного от облученных самцов.

Материал и методы

Животные. Родительское поколение (F_0) экспериментальных животных было представлено не трансгенными самцами рыб *D. rerio* и самкой трансгенной линии Tg (fabp10:TA; TRE:xmrk; krt4:GFP), несущей индуцибельный трансген в гетерозиготном состоянии. Данная линия характеризуется развитием гепатоцеллюлярных кар-

цином при действии индуктора доксициклина (DOX) и их регрессом после его отмены.

Вещества/препараты. Разведения композиции ВР-С2 (производитель ООО «Нобель», серия M220321D33, срок годности до 01.03.2023) до рабочей концентрации 50 мг/л были выполнены из базового 2 % водного раствора *ex tempore* для уменьшения вероятности распада композиции в водной среде. Индуктор трансгена DOX (Alfa Aesar, Lot # F15X005) был разведен в воде в концентрации 60 мкг/мл.

Условия содержания. Половозрелых рыб содержали в стандартных условиях (температура 28,5 °С, световой режим 14/10 ч. свет/темнота) в рециркуляционной системе, за исключением периодов экспозиции к исследуемой композиции ВР-С2 и индукторе трансгена DOX. Кормление рыб производилось ежедневно. При заборе материала все животные (личинки и взрослые) были подвергнуты эвтаназии посредством помещения их на 30 мин. в 0,01 % раствор трикаина (Sigma-Aldrich, США).

Параметры облучения. Взрослые самцы рыб F_0 в возрасте 8 мес. были облучены рентгеновскими лучами в дозе 5 Гр (400 сГр/мин, расстояние от источника излучения 1000 мм) на линейном ускорителе Novalis-TX (Varian, США) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Облучение проводилось в пластиковых культуральных флаконах объемом 250 мл с минимальным количеством воды.

Обработка ВР-С2 и формирование экспериментальных групп. В течение 60 мин. после облучения взрослые самцы F_0 были разделены на две группы: группу F_0-1 , получившую лучевое воздействие в дозе 5 Гр и далее подвергнутую воздействию композиции ВР-С2 в дозе 50 мг/л на протяжении 24 ч. ($n = 7$) и группу F_0-2 , облученную без воздействия ВР-С2 ($n = 7$). Дополнительно были сформированы группа не облученного интактного контроля (F_0-3 , $n = 7$) и группа самцов не облученного контроля (F_0-4 , $n = 7$), подвергнутая воздействию композиции ВР-С2 в дозе 50 мг/л на протяжении 24 ч. Рыбы во всех группах содержались в стандартных условиях на протяжении 85 дней до момента их использования в разведении.

Искусственное оплодотворение. При разведении рыб использовалось искусственное оплодотворение, как описано в руководстве [9].

Кратко, смесь спермы от 4 самцов из каждой группы была использована для оплодотворения яйцеклеток, полученных от трансгенной Tg (fabp10:TA; TRE:xmrk; krt4:GFP) гетерозиготной самки.

Сортировка личинок. Сортировка личинок в возрасте 72 ч. по критерию наличия у них трансгена krt4:GFP (зеленое свечения эпидермиса) генетически сцепленного с индуцибельным трансгеном xmrk, проводилась под флуоресцентным стереомикроскопом SMZ1500 (Nikon, Japan). Отобранные трансгенные и не трансгенные личинки были помещены в отдельные 400 мл стаканы из расчета 25–30 личинок на 300 мл воды для дальнейшего культивирования.

Оценка скорости роста личинок. Не трансгенные личинки поколения F_1 , полученные от самцов групп F_0 -1, F_0 -2 и F_0 -3 и составившие группы F_1 -1 ($n = 30$), F_1 -2, ($n = 30$) и F_1 -3 ($n = 30$), соответственно, в возрасте 15 дней были помещены в 0,01 % раствор трикаина и после обездвиживания сфотографированы под стереомикроскопом. Длина тела личинок измерялась на индивидуальных изображениях в программе ImageJ. Личинки группы F_1 -3 были выращены до взрослого состояния и использованы на следующих этапах эксперимента (составили группы F_1 -4 и F_1 -6).

Индукция и реверсия опухолей. Трансгенные личинки генерации F_1 , полученные от самцов групп F_0 -1 (группа F_1 -1tg, $n = 29$, 19M/10F), F_0 -2 (группа F_1 -2tg, $n = 30$, 16M/14F), F_0 -3 (группа F_0 -3tg, $n = 26$, 18M/8F) в возрасте 6 мес. подвергнуты воздействию DOX (60 мкг/мл) на протяжении 25 дней при температуре 26 ± 1 °C и плотности посадки 0,5 л на рыбу. Смена раствора производилась еженедельно. Такому же воздействию были подвергнуты не трансгенные потомки интактных самцов группы F_0 -3 (группа F_1 -4, $n = 10$, 5M/5F) и самцов группы F_0 -4 (группа F_1 -5, $n = 10$, 5M/5F). В качестве контроля были использованы не трансгенные рыбы — потомки самцов группы F_0 -3, не подвергавшиеся никакому воздействию (группа F_0 -6, $n = 10$, 5M/5F). Сразу после отмены воздействия DOX рыбы были переведены в системные аквариумы для запуска процесса нормализации состояния печени и через 10 дней подвергнуты эвтаназии. По три рыбы из каждой группы были подвергнуты эвтаназии сразу после отмены индуктора для изучения тканей печени на пике морфологических изменений.

Гистологическая обработка. После эвтаназии образцы печени рыб вместе с прилегающими висцеральными органами были помещены на 48 ч. в 4 % нейтральный раствор формалина (ООО «БиоВитрум», Россия) для фиксации. После рутинной гистологической проводки и за-

ливки в парафин изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые затем были депарафинированы и окрашены гематоксилин-эозином по стандартной методике.

Количественная оценка гиперплазии гепатоцитов. Гистологические срезы печени от каждой рыбы были оцифрованы с помощью камеры RT slider (Diagnostic Instruments, США), установленной на микроскопе Axioskop 40 FL (Karl Zeiss, Германия) с использованием $\times 40$ объектива. С каждого образца получали не менее 3 изображений. Для морфометрического анализа выбирались изображения, на которых сопутствующие структуры (кровеносные сосуды, гиперпластические изменения холдангилярного эпителия, некрозы) отсутствовали или были представлены в минимальном количестве. Для количественной оценки уровня гиперплазии гепатоцитов использовалось программное обеспечение QuPath v.032, которое было настроено на выявление ядер гепатоцитов. Во всех случаях для подсчета ядер использовалась вся площадь изображения.

Статистический анализ. Количественные данные представлены в виде $M \pm m$. Проверяли гипотезу об отсутствии влияния используемой терапии на исход экспериментального воздействия, в связи с чем применяли двусторонние статистические тесты. Для оценки статистической значимости количественных различий между выборками использовали t-критерий в случае нормального распределения (оценивали по критерию Шапиро – Уилка). Для оценки различий в частоте гибели использовали точный критерий Фишера. Расчеты выполнены в пакете Statistica v. 10 (StatSoft, Россия).

Результаты

Выживаемость облученных рыб F_0 . На протяжении всего срока наблюдения от момента облучения до времени использования рыб в размножении (85 дней) в группе F_0 -3 (интактном контроле) остались живы все животные, в экспериментальной группе F_0 -1 наблюдалась гибель одной, а в группе F_0 -2 — двух рыб (табл.). Статистически значимых различий по выживаемости выявлено не было (точный критерий Фишера).

Эмбриональное и личиночное развитие рыб поколения F_1 . При анализе развивающихся трансгенных и не трансгенных эмбрионов, полученных от облученных и не облученных самцов, не было выявлено каких-либо различий между группами по таким критериям, как процент оплодотворения, количество аномалий и темп выхода личинок из яйцевых оболочек. Тем не менее, оценка длины тела личинок в возрасте

15 дней выявила статистически значимое отставание в темпе роста потомков облученных животных (группа F₁₋₂, n = 30), по сравнению с потомками интактных (группа F₁₋₃, n = 27, p < 0,0001, t-критерий) и подвергнутого воздействию облучения и композиции ВР-С2 (группа F₁₋₁, n = 25, p < 0,0001, t-критерий). При этом статистически значимых различий между группами F₁₋₁ и группой F₁₋₃ выявлено не было (рис. 1).

Выживаемость рыб поколения F1 при экспозиции к доксициклину. Поддержание трансгенных и не трансгенных рыб поколения F₁ в системных аквариумах на протяжении 6 мес. не выявила у них каких-либо признаков патологических процессов или случаев спонтанной гибели за весь период наблюдения. Дальнейшая субхроническая экспозиция трансгенных рыб к DOX на протяжении 25 дней выявила высокую токсичность этого препарата для рыб обоего пола. Характерными внешними проявлениями токсичности было развитие асцита в брюшной полости, бледность покровов и потеря аппетита с последующей гибелью ослабленного животного в течение нескольких дней от момента обнаружения описанных признаков.

Данные по выживаемости рыб в эксперименте с DOX представлены в таблице. К концу

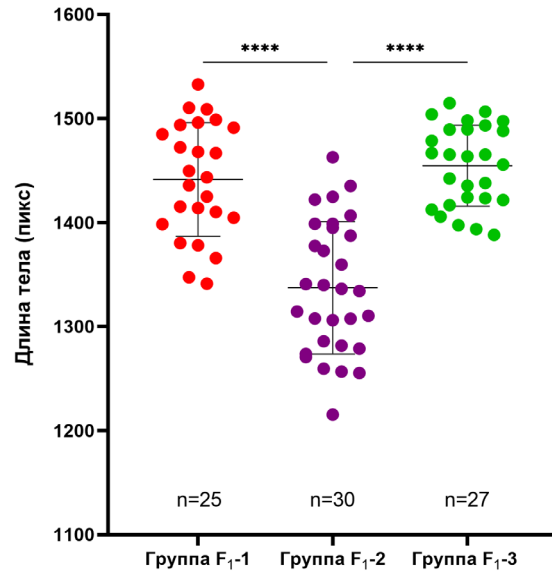


Рис. 1. Влияние рентгеновского облучения (5 Гр) взрослых самцов *Danio rerio* на длину тела их потомства в возрасте 15 дней

Группа F₁₋₁ — потомки рыб F₀₋₁, подвергнутых облучению и обработке композиции ВР-С2, группа F₁₋₂ — потомки рыб F₀₋₂, подвергнутых облучению и группа F₁₋₃ — потомки не облученных контрольных рыб F₀₋₃. **** — p < 0,0001, t-критерий

Fig. 1. Effect of X-ray irradiation (5 Gy) on body length of offspring from adult male *Danio rerio* at 15 days of age. Offspring were grouped as follows: F₁₋₁ — offspring of irradiated and treated with BP-C2 male fish F₀₋₁; F₁₋₂ — offspring of irradiated male fish F₀₋₂; F₁₋₃ — offspring of non-irradiated control fish F₀₋₃. **** — p < 0,0001, t-test

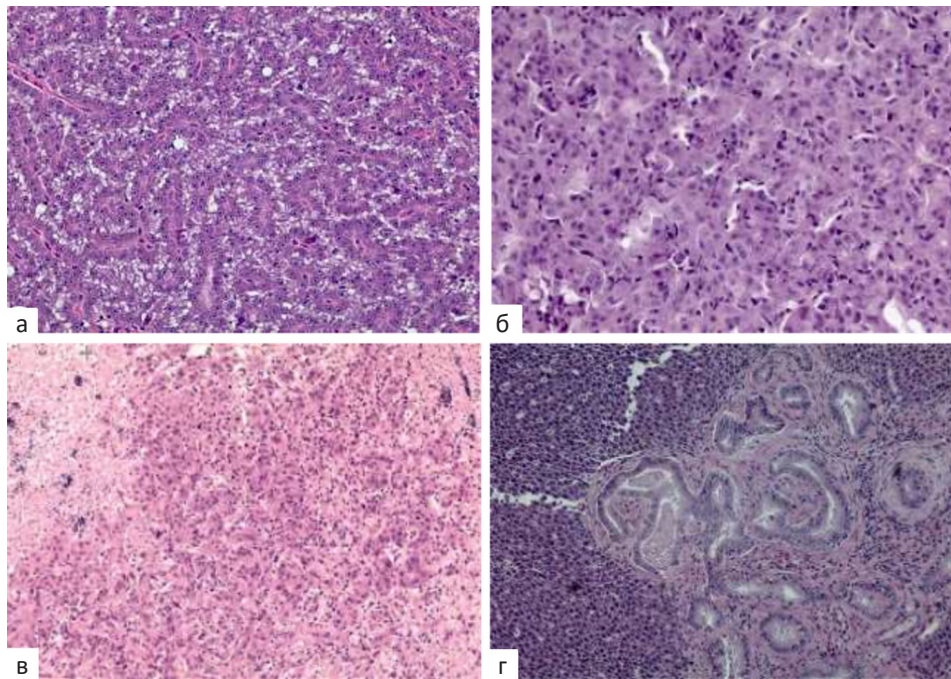


Рис. 2. Микрофотографии печени рыб

а — нормальная морфология печени рыбы, характеризующаяся наличием балочной структуры; б — гепатоцеллюлярная карциномы, индуцированная у трансгенной рыбы при действии доксициклина. Опухоль характеризуется потерей балочной структуры, выраженным ядерным и клеточным полиморфизмом, наличием многоядерных клеток и большим количеством митотических фигур; в — некротические изменения ткани печени трансгенной рыбы при действии доксициклина; г — пролиферация холангиолярного эпителия и развитие фиброзной ткани у трансгенной рыбы через 10 дней после отмены экспозиции к доксициклину. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400

Fig. 2. Microphotographs of fish liver

а — tubular architecture of normal fish liver; б — doxycycline induced hepatocellular carcinoma (HCC) in transgenic fish. The HCC display a loss of tubular architecture, pronounced cellular and nuclear polymorphism, the presence of multinucleated cells, and a large number of mitotic figures; в — necrotic changes in the liver tissue of transgenic fish upon doxycycline treatment; г — proliferation of biliary epithelial cells and development of fibrous tissue in transgenic fish 10 days after doxycycline withdrawal. (H&E, × 400)

Выживаемость рыб после экспериментальных воздействий Survival rate of the fish under experimental condition

Группы F0	Воздействие	Количество рыб, выживших после облучения		Группы F1	Воздействие	Количество рыб, выживших в период экспозиции к DOX		Количество рыб, выживших после отмены DOX	
		на 1 день	на 85 день			на 1 день	на 25 день	на 26 день*	на 35 день
F0-1	облучение + BP-C2	7	6	F1-1tg	DOX	29	21	18	16
F0-2	облучение	7	5	F1-2tg	DOX	30	24	21	21
F0-3	---	7	7	F1-3tg	DOX	26	20	17	16
				F1-4	DOX	10	10	7	7
				F1-6	---	10	10	7	7
F0-4	BP-C2	7	7	F1-5	DOX	10	10	7	7

* — по 3 рыбы из каждой группы были взяты для гистологического анализа

экспозиции индуктора в группе F₁-1tg в живых осталось 72,4 % рыб, в группе F₁-2tg — 80 % и в группе F₁-3tg — 76,9 % (различия между группами не значимы по точному критерию Фишера). К этому времени визуально печень выживших рыб имела увеличенные размеры, по сравнению с рыбами из группы интактного контроля F₁-6.

Сразу после отмены DOX по 3 особи из каждой группы трансгенных рыб были подвергнуты эвтаназии, после чего проводилось гистологическое исследование структуры печени на пике действия индуктора. После перевода оставшихся рыб в чистую воду за 10 дней погибло 2 особи из группы F₁-1tg и одна из группы F₁-3tg. Каких-либо признаков токсичности, развивающейся у трансгенных животных, у не трансгенных рыб из групп F₁-4 и F₁-5, подвергнутых воздействию DOX на протяжении 25 дней, не наблюдалось. В целом, спонтанная гибель трансгенных рыб в эксперименте была статистически значимо выше, чем не трансгенных (23/66 vs 0/24, $p < 0,01$, точный тест Фишера).

Гистологический анализ печени. Гистологический анализ печени у интактных (группа F1-6) и не трансгенных рыб, подвергнутых воздействию DOX (группы F1-4 и F1-5), не выявил каких-либо отклонений от нормы. Ткань печени таких рыб имела выраженную, хотя и в меньшей степени, чем у млекопитающих, балочную структуру. Гепатоциты содержали отчетливые округлые ядра с хорошо выраженными ядрышками и однородную эозинфильную цитоплазму (рис. 2, а).

На момент отмены индуктора печень трансгенных рыб из групп F₁-1tg, F₁tg и F₁-3tg имела характерные признаки умеренно дифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы и характеризовалась полной потерей балочной структуры, выраженным полиморфизмом ядер и клеток, наличием гигантских и многоядерных клеток, неоднородной окраской цитоплазмы и присутствием большого количества митозов (рис. 2, б).

У некоторых рыб были обнаружены обширные, захватывающие большую часть объема печени, некротические изменения (рис. 2, в).

Гистологическая картина печени рыб, подвергнутых эвтаназии через 10 дней после перевода в чистую воду, характеризовалась гиперпластической реакцией гепатоцитов различной степени выраженности. Окраска цитоплазмы гепатоцитов была однородной и варьировала в разных

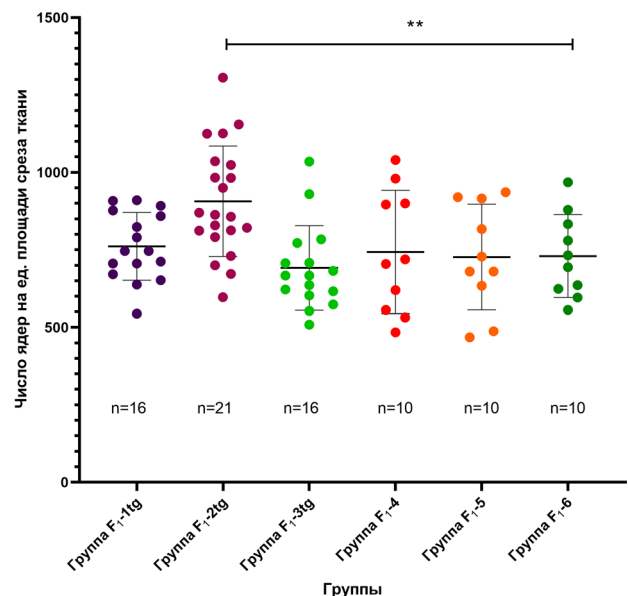


Рис. 3. Количество ядер гепатоцитов на площадь среза ткани печени рыб через 10 дней после отмены DOX

Группы F₁-1-5 подверглись воздействию DOX. Группа F₁-1tg — трансгенное потомство облученных и обработанных BP-C2 самцов, группа F₁-2tg — трансгенное потомство облученных самцов, группа F₁-3tg — трансгенное потомство необлученных самцов, группа F₁-4 — не трансгенное потомство интактных самцов, группа F₁-5 — не трансгенное потомство самцов, обработанных BP-C2. Группа F₁-6 — не трансгенные рыбы, не подвергавшиеся каким-либо воздействиям. ** — $p < 0,01$, t-критерий

Fig. 3. Number of hepatocyte nuclei per liver tissue area in fish 10 days after DOX withdrawal

Groups F₁-1 to F₁-5 were exposed to DOX. F₁-1tg: Transgenic offspring of irradiated and BP-C2-treated males; F₁-2tg: Transgenic offspring of irradiated males; F₁-3tg: Transgenic offspring of non-irradiated males; F₁-4: Non-transgenic offspring of intact males; F₁-5: Non-transgenic offspring of BP-C2-treated males; F₁-6: Non-transgenic fish that were not exposed to any treatment. ** — $p < 0.01$, t-test

образцах от слабо базофильной до выраженной эозинофильной. Крайне редко обнаруживались остаточные некротические изменения паренхимы печени и небольшие очаговые пролифераты холангиолярного эпителия (рис. 2, г).

Оценка уровня гиперплазии после отмены DOX. Основным количественным критерием степени нормализации был выбран уровень гиперплазии гепатоцитов. Учитывая отсутствие значимых различий в уровне гиперплазии в зависимости от пола рыб внутри групп, данные, полученные от самцов и самок, были объединены. В результате исследования было обнаружено, что среднее количество ядер гепатоцитов на микрофотографиях печени трансгенных рыб составило $761,3 \pm 27,4$, $906,8 \pm 38,9$ и $691,6 \pm 34,1$ в группах F_1 -1tg; F_1 -2tg и F_1 -3tg соответственно. Среднее количество гепатоцитов на изображениях печени не трансгенных рыб в группах F_1 -4; F_1 -5 и F_1 -6 (объединены данные со сроков 25 и 36 дни опыта) составило $743,1 \pm 62,9$, $726,7 \pm 53,9$ и $729,8 \pm 42,3$ соответственно.

Обнаружено, что количество гепатоцитов у трансгенных рыб в группах F_1 -1tg и F_1 -3tg и у не трансгенных рыб, подвергнутых действию DOX в группах F_1 -4 и F_1 -5, статистически значимо не отличалось от значения этого показателя для рыб в группе интактного контроля F_1 -6 ($p > 0,05$, t-критерий) (рис. 3). В то же время количество ядер гепатоцитов в печени трансгенных потомков облученных рыб в группе F_1 -2tg статистически значимо ($p < 0,01$, t-критерий) превышало значения данного показателя у рыб во всех остальных группах.

Обсуждение

Облучение самцов в дозе 5 Гр не привело в нашем исследовании к каким-либо существенным отклонениям от нормы у их потомства на эмбриональной стадии, кроме отставания в темпах роста. Известно, что продолжительное непрерывное низкодозовое (8,7 мГр/ч, кумулятивная доза за месяц 5,2 Гр) гамма-облучение рыб *D. rerio* приводит к значительному снижению репродуктивной способности как через месяц, так и через год после облучения, нарушению развития эмбрионов, повышению уровня окислительного стресса и повреждений ДНК у потомков [10–11]. В нашем эксперименте самцы были облучены однократно в дозе 5 Гр при 400 сГр/мин (24 Гр/ч) и участвовали в размножении только через 85 дней, что позволяет предположить естественную элиминацию как зрелых поврежденных сперматозоидов, так и незрелых предшественников со значительными повреждениями ДНК. Соответственно, грубые нарушения развития потомства в данном исследовании не

обнаруживались, однако наблюдаемое у потомства облученных рыб (группа F_1 -2) отставание в росте от групп F_1 -1 и F_1 -3 могло возникнуть за счет радиационно-индуцированных нелетальных мутаций или наследуемых эпигенетических изменений, ведущих к геномной нестабильности [3, 8].

Одним из воздействий, влияющих на базовые функции клетки, такие как пролиферация, рост и дифференцировка, является гиперэкспрессия мутантных форм протоонкогенов или измененная функция некоторых рецепторов, активирующих важнейшие сигнальные каскады клетки [12]. К этой категории относится и гиперэкспрессия мутантной формы эпидермального фактора роста (EGFR) и его аналога у рыб *xmrk* [13], усиление активности которого при воздействии индуктора DOX приводит к формированию в печени трансгенных организмов гепатоцеллюлярных карцином, способных подвергаться реверсии при прекращении действия индуктора [14]. Следует отметить, что экспозиция к DOX обладает выраженным токсическим действием только на трансгенных рыб, приводя за 25 дней к гибели от 30 до 40 % экспериментальных животных, вследствие нарастающей дисфункции печени. При этом по морфологическим [15], молекулярным [16] и системным [17] проявлениям, индуцибельные опухоли печени у трансгенных *D. rerio* не отличаются от спонтанных или индуцированных канцерогенами гепатоцеллюлярных карцином рыб и млекопитающих.

При отмене индуктора вызванные им морфологические и функциональные изменения подвергаются регрессии за счет апоптоза или нормализации трансформированных клеток в органе мишени, а также образования *de novo* гепатоцитов (гиперплазии) из клеток предшественников [14].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что у трансгенных потомков облученных самцов процесс нормализации ткани печени протекает медленнее, чем у потомков не облученных самцов, или облученных и подвергнутых воздействию композиции ВР-С2. Принимая во внимание данные литературы, можно предположить, что наиболее вероятно это явление связано с нарушением апоптоза в гепатоцитах трансгенных рыб [8, 14] и/или повышенной чувствительностью печени к стимулам пролиферации. При этом потомки самцов, подвергнутых воздействию композиции ВР-С2, могут нести меньший груз наследственных мутаций и, по этой причине, иметь практически нормальную чувствительность к факторам, стимулирующим пролиферативные процессы.

Защитное действие полифенольной композиции косвенно подтверждается и тем, что

многие природные полифенольные соединения рассматриваются в качестве радиопротекторов, геропротекторов, антимуtagenных, антиканцерогенных и противоопухолевых средств. Это определяется способностью этих веществ связывать активные формы кислорода, обеспечивая защиту ДНК от индуцированных повреждений, они могут стимулировать репарацию ДНК, индуцировать апоптоз, модулировать сигнальные пути, регулировать клеточный цикл и оказывают другие эффекты [18–21].

Выводы

Наше исследование показало, что у потомков облученных рыб наблюдается замедление роста и изменение чувствительности клеток к действию онкогенных и антионкогенных стимулов, а также выявило потенциальную возможность профилактики трансгенерационных последствий облучения с помощью полифенольных соединений, в частности ВР-С2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Этические принципы

Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с требованиями документа «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. СЕД 123». Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Протокол № 8 от 18.06.2020).

Ethical Principles

The ethical principles for the treatment of laboratory animals were followed in accordance with the requirements of the document «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or Other Scientific Purposes. ETS 123». The research protocol was reviewed and approved by the local Ethics Committee of the N.N. Petrov NMRC of Oncology (Protocol No. 8 of 18.06.2020).

Финансирование

Публикация подготовлена при поддержке РФФ (грант № 20-15-00330-П).

Funding

The publication was supported by RSF (grant No. 20-15-00330-П).

Участие авторов

Анисимов В.Н. — концепция, планирование эксперимента, редактирование рукописи;
Мизгирев И.В. — проведение эксперимента, обработка результатов;
Панченко А.В. — подготовка рукописи и иллюстративного материала;
Вон Ю.Д. — патоморфологические исследования;
Осипов А.А. — подбор доз и проведения облучения рыб F₀;

Федорос Е.И. — редактирование рукописи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Authors' contributions

Anisimov V.N. — idea of publication, experiment planning, manuscript editing;

Mizgirev I.V. — conducting the experiment, results processing; Panchenko A.V. — preparation of the manuscript and illustrative material;

Von Y.D. — pathomorphological studies;

Osipov A.A. — selection of doses and irradiation of fish F₀; Fedoros E.I. — manuscript editing.

All authors have approved the final version of the article before publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Friedman D.L., Whitton J., Leisenring W., et al. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102: 1083-1095.-DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djq238>.
- Choi D.K., Helenowski I., Hijiya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer.* 2014; 135(8): 1764-73.-DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.28991>.
- Воробцова И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома и предрасположенности к канцерогенезу. Вопросы онкологии. 2008; 54(4): 490-493. [Vorobtsova I.E. Transgenerational transmission of radiation-induced genomic instability and predisposition to carcinogenesis. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology.* 2008; 54(4): 490-493. (In Rus)].
- Little M.P., Goodhead D.T., Bridges B.A., et al. Evidence relevant to untargeted and transgenerational effects in the offspring of irradiated parents. *Mutat Res.* 2013; 753: 50-67.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.04.001>.
- Панченко А.В., Пигарев С.Е., Федорос Е.И., и др. Трансгенерационный канцерогенез, индуцированный уретаном, у потомков мышей-самцов BALB/C, подвергнутых общему равномерному гамма-облучению. *Вопросы онкологии.* 2023; 69(2): 246-252.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252>. [Panchenko A.V., Pigarev S.E., Fedoros E.I., et al. Urethane-induced trans-generational carcinogenesis in the offsprings of BALB/c male mice exposed to total body gamma irradiation. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology.* 2023; 69(2): 246-252. (In Rus)].-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252>.
- Lewandowska A., Lewandowski T., Rudzki M., et al. Cancer prevention – review paper. *Ann Agric Environ Med.* 2021; 28(1): 11-19.-DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/116906>.
- Пигарев С.Е., Панченко А.В., Федорос Е.И., и др. Влияние полифенольной композиции ВР-С2 на индуцированный уретаном канцерогенез лёгкого у потомства облучённых самцов мышей линии BALB/c. *Бюл. экпер. биол.* 2023; 176(8): 237-241.-DOI: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-237-241>. [Pigarev S.E., Panchenko A.V., Fedoros E.I., et al. Effect of polyphenolic composition ВР-С2 on lung carcinogenesis induced with urethane in progeny of irradiated BALB/c male mice. *Bull Exp Biol Med.* 2023; 176(8):

- 237-241. (In Rus)].-DOI: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-237-241>.
8. Kong E.Y., Cheng S.H., Yu K.N. Zebrafish as an In Vivo Model to Assess Epigenetic Effects of Ionizing Radiation. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12): 2108.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17122108>.
 9. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Univ of Oregon Press, Eugene. 2020. URL: https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
 10. Hurem S., Gomes T., Brede D.A., et al. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Res.* 2017; 159: 564-578.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.053>.
 11. Hurem S., Gomes T., Brede D.A., et al. Gamma irradiation during gametogenesis in young adult zebrafish causes persistent genotoxicity and adverse reproductive effects. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 154: 19-26.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.031>.
 12. Haschek W.M., Rousseaux C.G., Wallig M.A. Manifestations of toxic cell injury. In Ed. by Wallig M.A., Haschek W.M., Rousseaux C.G., Bolon B. *Fundamentals of Toxicologic Pathology.* Elsevier. 2010: 9-42.- DOI: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02486-8>.
 13. Meierjohann S., Mueller T., Schartl M., Buehner M. A structural model of the extracellular domain of the oncogenic EGFR variant Xmrk. *Zebrafish.* 2006; 3(3): 359-69.-DOI: <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.3.359>.
 14. Li Y., Agrawal I., Gong Z. Reversion of tumor hepatocytes to normal hepatocytes during liver tumor regression in an oncogene-expressing transgenic zebrafish model. *Dis Model Mech.* 2019; 12(10): dmm039578.-DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.039578>.
 15. Nakayama J., Gong Z. Transgenic zebrafish for modeling hepatocellular carcinoma. *MedComm.* 2020; 1(2): 140-156.-DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.29>.
 16. Zheng W., Li Z., Nguyen A.T., et al. Xmrk, kras and myc transgenic zebrafish liver cancer models share molecular signatures with subsets of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014; 9(3): e91179.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091179>.
 17. Zhao Y., Huang X., Ding T.W., Gong Z. Enhanced angiogenesis, hypoxia and neutrophil recruitment during Myc-induced liver tumorigenesis in zebrafish. *Sci Rep.* 2016; 6: 31952.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091179>.
 18. Cháirez-Ramírez M.H., de la Cruz-López K.G., García-Carrancá A. Polyphenols as antitumor agents targeting key players in cancer-driving signaling pathways. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 710304.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710304>.
 19. Obrador E., Salvador-Palmer R., Pellicer B., et al. Combination of natural polyphenols with a precursor of NAD⁺ and a TLR2/6 ligand lipopeptide protects mice against lethal γ radiation. *J Adv Res.* 2023; 45: 73-86.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.05.005>.
 20. Yoshioka Y., Ohishi T., Nakamura Y., et al. Anti-cancer effects of dietary polyphenols via ros-mediated pathway with their modulation of microRNAs. *Molecules.* 2022; 27(12): 3816.-DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27123816>.
 21. Панченко А.В., Тындык М.Л., Федорос Е.И., и др. Сравнительный анализ экспериментальных данных о влиянии различных полифенолов на продолжительность жизни и старение. *Усп. Геронтологии.* 2019; 32(3): 325-330. [Panchenko A.V., Tyndyk M.L., Fedoros E.I., et al. Comparative analysis of experimental data on the effects of different polyphenols on lifespan and aging. *Adv Gerontol.* 2019; 32(3): 325-330. (In Rus)].

Поступила в редакцию / Received / 08.09.2023
 Прошла рецензирование / Reviewed / 14.10.2023
 Принята в печать / Accepted for publication / 19.10.2023

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Владимир Николаевич Анисимов / Vladimir N. Anisimov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3683-861x>.
 Игорь Викторович Мизгирев / Igor V. Mizgirev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0710-4094>.
 Андрей Владимирович Панченко / Andrey V. Panchenko / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5346-7646>.
 Юлия Дюсековна Вон / Yulia D. Von / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5161-5940>.
 Алексей Александрович Осипов / Aleksei A. Osipov / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-7505-0870>.
 Елена Ивановна Федорос / Elena I. Fedoros / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2426-9843>.

