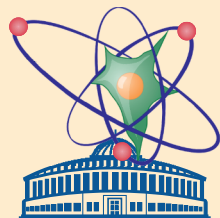


Российская академия наук  
Радиобиологическое общество РАН  
Объединенный институт ядерных исследований



# **АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РАДИОБИОЛОГИИ**

**К 70-летию открытия структуры ДНК**

Международная конференция

Дубна, 19–20 октября 2023 г.

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ.  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ В РАДИОБИОЛОГИИ**

**К 70-летию открытия структуры ДНК**

Международная конференция

Дубна, 19–20 октября 2023 г.

*Материалы конференции*

Дубна 2023

A43 **Актуальные** проблемы радиационной биологии. Молекулярно-генетические исследования в радиобиологии: К 70-летию открытия структуры ДНК: Междунар. конф. (Дубна, 19–20 окт. 2023 г.): Матер. конф. — Дубна: ОИЯИ, 2023. — 129 с.

ISBN 978-5-9530-0601-9

В сборнике представлены материалы международной конференции «Актуальные проблемы радиационной биологии. Молекулярно-генетические исследования в радиобиологии».

Конференция приурочена к 70-летию открытия структуры ДНК: в апреле 1953 г. в журнале «Nature» была опубликована статья Джеймса Уотсона и Фрэнсиса Крика «Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты», в которой впервые предложена модель пространственной структуры ДНК — двойная спираль. В программу конференции включены лекции ведущих ученых и сообщения о современных экспериментальных данных и теоретических разработках в области изучения механизмов формирования генетических и эпигенетических изменений в клеточных структурах, подвергнутых действию ионизирующих излучений разного качества, и последствий этих изменений.

Тезисы докладов представлены в авторской редакции.

## **Оргкомитет конференции:**

### *Сопредседатели:*

**Красавин Е.А.**, чл.-корр. РАН, председатель Научного совета РАН по радиобиологии, ЛРБ ОИЯИ

**Рубанович А.В.**, д.б.н., проф., ИОГен РАН

**Ушаков И.Б.**, акад. РАН, президент Радиобиологического общества РАН, ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

### *Члены оргкомитета:*

**Кошлань И.В.**, *отв. секретарь*, к.б.н., ЛРБ ОИЯИ

**Найдич В.И.**, *отв. секретарь*, к.х.н., Научный совет РАН по радиобиологии

**Борейко А.В.**, д.б.н., проф., ЛРБ ОИЯИ

**Бугай А.Н.**, д.ф.-м.н., проф., ЛРБ ОИЯИ

**Васильев С.А.**, д.б.н., проф., НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

**Гераськин С.А.**, д.б.н., проф., ВНИИ радиологии и агроэкологии

**Замулаева И.А.**, д.б.н., проф., МРНЦ им. А.Ф. Цыба Минздрава РФ

**Иванов А.А.**, д.м.н., проф., ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

**Москалев А.А.**, чл.-корр. РАН, ИБ Коми НЦ УрО РАН

**Осипов А.Н.**, д.б.н., проф. РАН, ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

**Салеева Д.В.**, к.м.н., ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

## **Организаторы конференции:**

Научный совет РАН по радиобиологии

Радиобиологическое общество РАН

Лаборатория радиационной биологии ОИЯИ

## **Место проведения конференции**

г. Дубна, Объединенный институт ядерных исследований,  
Дом международных совещаний, ул. Строителей, д.2

## Содержание

<b>ЭВОЛЮЦИЯ И ДРАМА ИДЕЙ О МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПРИРОДЕ И ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ГЕНОВ И ХРОМОСОМ</b>	10
--	----

*Н.Н. Хромов-Борисов*

---

<b>ТЕРМОЦИКЛ - ДВИЖУЩАЯ СИЛА ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА И ОТБОРА БИОПОЛИМЕРОВ, БАЗОВАЯ ОСНОВА ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЖИЗНИ</b>	13
---	----

*С.Д. Варфоломеев*

---

<b>РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА</b>	14
--	----

*С.А. Абдуллаев, С.И. Глухов, Д.В. Салеева, Э.В. Евдокимовский*

---

<b>ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ МИКРОЯДЕР В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ В ОСТРОМ ЛУЧЕВОМ ПЕРИОДЕ</b>	17
---	----

*О.С. Аксёненко, А.Е. Сусленкова, Е.А. Шурова, Н.Н. Веялкина*

---

<b>ИНДУКЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ НИЗКИМИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ДОЗАМИ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА С РАЗНЫМИ ЛПЭ</b>	20
---	----

*Т.А. Белякова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Н.С. Стрельникова, А.Г. Васильева*

---

<b>СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТИЯ В ВИДЕ СВОБОДНОЙ ТРИТИЕВОЙ ВОДЫ И ВНЕШНЕГО <math>\gamma</math>-ОБЛУЧЕНИЯ. ПЕРИОДЫ ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ ТРИТИЯ ИЗ ОРГАНИЗМА И РАСЧЕТ ПОГЛОЩЕННЫХ ДОЗ</b>	23
--	----

*Л.Г. Бондарева*

---

<b>РАДИАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И УСКОРЕННЫЕ ТЯЖЕЛЫЕ ИОНЫ</b>	26
---	----

*А.В. Борейко*

---

<b>МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНДУКЦИИ И РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ</b>	30
--	----

*А.Н. Бугай, М. Батмунх, Л. Баярчимэг, М.А. Васильева, Э.Б. Душанов, А.Ю. Пархоменко*

**ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ВТОРИЧНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ ПРИ  
ПРОХОЖДЕНИИ ПРОТОНОВ ЧЕРЕЗ БЕТОННУЮ КОНСТРУКЦИЮ** 32

*Т.М. Бычкова, О.В. Никитенко, Т.М. Трубченкова, Н.Ю. Воробьева,  
А.Г. Молоканов, А.Н. Осипов, А.А. Иванов*

---

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В РЕПАРАЦИИ РАЗРЫВОВ  
ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК** 35

*С.А. Васильев*

---

**ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИАПОПТИЧЕСКОГО  
ЭФФЕКТА АЛЬФА1-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ ПРИ  
ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ** 38

*М.В. Васин, И.Б. Ушаков*

---

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ  
ФОРМИРОВАНИЯ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СОСНЫ  
ОБЫКНОВЕННОЙ НА ХРОНИЧЕСКОЕ РАДИАЦИОННОЕ  
ВОЗДЕЙСТВИЕ** 40

*С.А. Гераськин, С.В. Битаршвили, В.С. Бондаренко, Е.В. Бондаренко,  
Д.В. Васильев*

---

**АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ГРЫЗУНОВ ИЗ ЗОНЫ  
ВЛИЯНИЯ ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОГО РАДИОАКТИВНОГО СЛЕДА** 43

*Е.Б. Григоркина, С.Б. Ракитин, Г.В. Оленев*

---

**ИНДУКЦИЯ ГЕННЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ МУТАЦИЙ ПОД  
ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И УСКОРЕННЫХ ИОНОВ  
АЗОТА В ГАПЛОИДНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ** 46

*Н.И. Жучкина, Н.В. Шванева, Н.А. Колтовая*

---

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ  
СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА  
НА ПУЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ IN VITRO** 49

*И.А. Замулаева, О.Н. Матчук, А.О. Якимова, С.Н. Корякин, В.А. Пикалов,  
С.А. Иванов*

---

**ИЗМЕНЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ** 53

*В.Н. Ильичева, И.Б. Ушаков*

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОМА У РАБОТНИКОВ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ** 56

*Д.С. Исубакова, О.С. Цымбал, Н.В. Литвяков, М.Ю. Цыпленкова, И.В. Мильто, Р.М. Тахауов*

---

**Кі-67 В ДИАГНОСТИКЕ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОМОЗГОВОГО ГЕМОПОЭЗА** 59

*Ю.Е. Квачева*

---

**ИЗУЧЕНИЕ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЭРИТРОЦИТОВ У ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИХ НЕПОСРЕДСТВЕННОМ КОНТАКТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ** 62

*И.Н. Когарко, В.В. Петушкова, Б.С. Когарко, Е.А. Нейфах, О.В. Ктиторова, И.И. Ганеев, Н.С. Кузьмина, Е.И. Селиванова*

---

**ЦИТОМНЫЙ АНАЛИЗ НАЗАЛЬНЫХ И БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ОСМОТРЕ РАЗНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ** 65

*М.Ф. Коняйкина, Е.К. Кривцова, А.Г. Кедрова, Г.В. Кравченко, Т.А. Гряян, Ю.С. Константинова*

---

**ЛАКТОФЕРРИН СНИЖАЕТ НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ** 68

*М.Ю. Копаева, А.Б. Черепов, И.Ю. Зарайская*

---

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОТОНАМИ И ПЛОТНОИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ** 71

*Е.В. Корякина, М.В. Трошина, В.И. Потетня, С.Н. Корякин, В.О. Сабуров, А.Н. Соловьев, А.А. Лычагин*

---

**СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ И НРРТ-МУТАГЕНЕЗ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ** 74

*И.В. Кошлань, Н.А. Кошлань, П. Блага, Ю.В. Мельникова, Д.В. Петрова, Р.Д. Говорун, И.В. Смирнова*

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ВАРИАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК  
ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ  
СРОКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ УГЛЕРОДА ИЛИ  
РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ** 77

*Е.А. Кузнецова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, С.И. Глухов, Т.В. Сирота,  
Т.А. Белякова, Н.П. Сирота*

---

**ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ РАДИОПРОТЕКТОРЫ И МЕХАНИЗМ ИХ  
ДЕЙСТВИЯ** 80

*П.Н. Лобачевский*

---

**ТРЕХЦВЕТНОЕ FISH-ОКРАШИВАНИЕ: УЧАСТИЕ ОТДЕЛЬНЫХ  
ХРОСОМ В РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ  
ТРАНСЛОКАЦИЯХ** 83

*Е.Е. Ломоносова, В.Ю. Нугис, М.Г. Козлова, В.А. Никитина, Г.П. Снигирёва,  
А.Н. Галстян*

---

**ОЦЕНКА ДВУХНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ  
УЛЬТРАКОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ  
В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА** 86

*А.Т. Манукян, Н.С. Бабаян, Р.М. Григорян, Н.К. Саркисян, Б.А. Григорян,  
Р.М. Арутюнян*

---

**СТРАТЕГИЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
ПРЕПАРАТОВ** 89

*А.А. Мельникова, Р.С. Киркин, Л.Н. Комарова*

---

**БЕЛОК PRR1 И СПОСОБЫ ЕГО ИНГИБИРОВАНИЯ** 91

*А.А. Мельникова, Р.С. Киркин, Л.Н. Комарова*

---

**ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ  
ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПО  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ КРИТЕРИЯМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО  
МОЗГА КРЫС** 93

*В.И. Нагиба, И.А. Варганова, Г.Л. Паточка*

---

**ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОЦИТОВ СТРИПАЛЛИДАРНОЙ СИСТЕМЫ  
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ** 96

*Н.А. Насонова, Д.А. Соколов, А.Г. Кварацхелия*



**ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ГАММА-НЕЙТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ** 98

*Г.А. Посыпанова, А.А. Осипов, А.С. Журник, Ю.П. Семочкина*

---

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ  
ЦИТОКИНОВ В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЙ ПЕРИОД  
ПОСЛЕ ПРОЛОНГИРОВАННОГО  $\gamma$ ,n-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ  
В НИЗКИХ ДОЗАХ** 101

*А.В. Родина, О.В. Высоцкая, И.В. Чешигин, А.С. Журник, Е.Ю. Москалева*

---

**К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ ХЛОРОФИЛЛИНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ  
ДНК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ** 104

*Л.А. Ромодин, М.А. Игнатов*

---

**МАЛЫЕ ДОЗЫ РАДИАЦИИ И КОМПОНЕНТЫ НЕКОТОРЫХ  
РАСТЕНИЙ КАК НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ СНИЖЕНИЯ  
РАДИОИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК** 107

*Д.В. Салеева, Н.Ф. Раева, Г.Д. Засухина*

---

**ВОЗДЕЙСТВИЕ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ЖИВЫЕ  
КЛЕТКИ И НУКЛЕОИДЫ ТАКИХ ЖЕ КЛЕТОК** 110

*Н.П. Сирота, В.А. Пикалов, Е.Н. Смирнова, О.М. Розанова, Т.А. Белякова*

---

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ДОЗ ПРОТОНОВ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ  
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ *EX VIVO* НА ИНДУКЦИЮ  
СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ** 113

*Н.С. Стрельникова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова,  
А.В. Смирнов, А.Е. Шемяков*

---

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ  
ГЕНОВ АУТОФАГИИ С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ  
ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ  
РАБОТНИКОВ ОБЪЕКТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО  
ИЗЛУЧЕНИЯ** 116

*Р.М. Тахауов, Д.С. Исубакова, О.С. Цымбал, Н.В. Литвяков,  
М.Ю. Цыпленкова, И.В. Мильто*

---

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОБОЧНОГО РАДИАЦИОННОГО  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ  
С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ** 119

*И.К. Хвостунов, В.В. Крылов, Т.Ю. Кочетова, О.Н. Коровчук,  
А.С. Жиронкина, С.Н. Корякин, С.А. Иванов*

**ПЕРЕНОС ЗАРЯДА И КВАНТОВОЙ ИНФОРМАЦИИ В ДНК ПРИ  
ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ** 122

*А.В. Чижев, Д. Чевизович, С.Э. Ширмовский*

---

**РЕПАРАЦИЯ ДНК И КЛОНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК  
МАММОСФЕР ЛИНИИ МСF-7 ПОСЛЕ ГАММА-НЕЙТРОННОГО  
ОБЛУЧЕНИЯ** 124

*В.Г. Шуватова, Д.А. Шапошникова*

---

**ВЛИЯНИЕ ПРОТОННОГО И  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ПУЛ  
ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ  
В МОДЕЛИ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ В16 *IN VIVO*** 127

*А.О. Якимова, О.Н. Матчук, Е.И. Селиванова, В.Р. Гусарова, В.А. Мосина,  
С.Н. Корякин, И.А. Замулаева*

## ЭВОЛЮЦИЯ И ДРАМА ИДЕЙ О МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПРИРОДЕ И ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ГЕНОВ И ХРОМОСОМ

*Н.Н. Хромов-Борисов*

Комиссия РАН по борьбе с лженаукой, Москва, Санкт-Петербург, Россия  
Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

*Резюме.* История представлений о молекулярной природе генов и хромосом и о механизмах их воспроизведения и изменений увлекательна и поучительна. Умозрительные догадки и споры, являются ли гены белками или нуклеиновыми кислотами, и воспроизводятся ли они наподобие кристаллов, или же матричным путем, разрешились революционным открытием Уотсоном и Криком пространственной структуры ДНК (двойной спирали). Началась эра молекулярной биологии и были сформулированы ее основополагающие принципы.

*Ключевые слова:* история науки, генетика, гены, хромосомы, белки, ферменты, нуклеиновые кислоты, ДНК, комплементарность, мутации, мутационный процесс, центральная догма молекулярной биологии, правило принуждения, конвариантная редупликация, принцип усилителя.

Повторение опытов Менделя и переоткрытие его законов в 1900 году породило новую науку «генетику». Возникло представление о наследственности факторах, которые получили краткое и хлесткое название «гены». Многие выдающиеся исследователи задумывались об их молекулярной природе и механизмах воспроизведения.

Белки или нуклеиновые кислоты?

Догадки: **гены – белки** с каталитической активностью (ферменты) (Driesch, 1894; Hagedoorn, 1911; Goldschmidt, 1916; Troland, 1917; Correns, 1919). Гены – регуляторы ферментов (Wright, 1916). Хромосомы – это огромные белковые молекулы, в которых радикалы распределены в определенном для каждого вида порядке (Кольцов, 1927). Гены являются группами атомов внутри белковых молекул, а хромосомы – параллельными объединениями белковых молекул (Przibram, 1927). Хромосомы являются молекулярными агрегатами (Wrinch, 1934). Ген или целое хромосомное волокно – аperiодическое твердое тело (аperiодический кристалл) (Schrödinger, 1945).

**Гены – нуклеиновые кислоты.** Догадки (Miescher, 1898). Гены - это нуклеиновые кислоты, встроенные в хроматин в виде высокодифференцированных коллоидно-молекулярных структур (Troland, 1917). Гены – варианты (изомеры) тимонуклеиновой кислоты (Demerec, 1933). Эксперименты: генетическая трансформация (Griffith, 1928; Avery, MacLeod, McCarthy, 1944); опыты с радиоактивными метками белков и ДНК у бактериофага; Hershey, Chase, 1952); сборка и разборка на белок и РНК у вируса табачной мозаики (ВТМ) и их перемешивание (Gierer, Schramm, 1956; Fraenkel-Conrad, Singer, 1957); «обрезание хвостов» в белке оболочки ВТМ (Harris, Knight, 1952) наподобие опытов Вейсмана с отрубанием хвостов мышам.

**Воспроизведение генов и хромосом.** Догадки: ферментативный автокатализ (Troland, 1917). Генная структура подобно кристаллу притягивает к себе из протоплазмы материал подобного же рода, отливая рядом с исходным геном идентичную копию первого (Muller, 1922). Сложность наследственной молекулы столь велика, что ее копия не может создаваться в клетке заново. Она возникает только при наличии в клетке уже готовой молекулы – *затравки*. *Omnia molecula ex molecula.*

(Кольцов, 1935). Включаются в мицеллы только те молекулы, которые являются копиями (репликами) уже присутствующих молекул (Wrinch, 1936). Ген создает рядом с собой изображение, копию самого себя, и рядом с исходной цепью образуется дубликат цепи. Такое гено-строительство не является «автокатализом» (Muller, 1936).

Процесс копирования гена аналогичен копированию граммофонной записи с негатива, относящегося к оригиналу как антитело к антигену (Haldane, 1937). Для максимальной стабильности две молекулы должны иметь *комплементарные поверхности*, подобно чекану и монете. Только межмолекулярные взаимодействия (ван-дер-ваальсовы силы, электростатические взаимодействия, водородные связи) придадут стабильность системе из двух молекул с *комплементарными* структурами, расположенными бок о бок, а не из двух молекул с идентичными структурами (Pauling, Delbrück, 1940). Выпуклости и углубления, темное и светлое, изображение и его зеркальное отражение, положительные и отрицательные заряды могут привести к воспроизведению формы (Friedrich-Freksa 1940). Ген воспроизводится, образуя *комплементарную матрицу*, на которой синтезируется поверхность нового гена (Emerson, 1945). Неверно и бесполезно считать самовоспроизведение генов «автокаталитическим» процессом. Кристаллизация не может служить аналогией для дубликации генов (Muller, 1947). Трудно представить, как подобное может притягивать подобное. Самоудвоение может включать объединение одной части с противоположной или комплементарной частью (Watson, Crick, 1953).

**Моделирование пространственной структуры ДНК.** «Самая важная проблема с нуклеиновыми кислотами состоит в том, что мы совершенно не знаем, что они делают» (Watson до открытия). Результаты рентгеноструктурного анализа приводили к неопределенным интерпретациям. Масштабные атомно-молекулярные модели – эффективный инструмент обучения и исследований. **Модель Полинга-Кори:** тройная спираль, сахарофосфатные остовы внутри, азотистые основания снаружи (Pauling, Corey, 1953). **Модель Фрезера:** три нити вывернуты фосфатами наружу, азотистые основания обращены внутрь, однако не объяснено, по какому принципу они соединены (Fraser, 1953). **Модель Уотсона-Крика:** две антипараллельные нити, свёрнутые в левозакрученную винтовую линию (helix – спираль), необходимая для устойчивости и воспроизведения комплементарность обеспечивается парами  $A=T$  и  $G=C$  (Watson, Crick, 1953). Для окончательного подтверждения модели Уотсона-Крика потребовалось лет 20.

Попытки пересобрать ДНК и поиски иных форм продолжаются по сей день. В результате открыт **полиморфизм пространственной структуры ДНК**, сейчас известна 21 форма.

Уроки и последствия открытия пространственной структуры ДНК. Урок: устанавливая структуру биомолекулы, желательно задумываться о ее биологическом предназначении, о ее биологической функции. Последствия. Стало возможным экспериментально изучить механизмы синтеза бека и нуклеиновых кислот, механизмы мутагенеза и репарации генетических повреждений и расшифровать генетический код, о котором пророчески говорил Шредингер: хромосомы – наследственный шифровальный код (Schrodinger, 1945; Шредингер, 1947; 2009).

Принципы молекулярной биологии.

**Правило принуждения** (Хромов-Борисов, 2010) – важное звено в цепи молекулярно-биологических суждений. Его предтечей является высказывание известного популяризатора науки Феликса Ауэрбаха: «Беспорядок наступает “сам собой”, порядок можно создать только принуждением» (Auerbach, 1910; Ауэрбах, 1911). Стало понятным, что самовоспроизведение генов и хромосом – всего лишь метафора. В живых (биологических) системах на молекулярном уровне очень часто

происходят процессы, которые практически невозможны в неживых системах. И наоборот: в живых системах подавлены некоторые процессы, которые непринужденно происходят в неживых системах. Пример: клеточные ионные насосы. Можно сказать, что, *как правило*, природные молекулярно-биологические процессы осуществляются *по принуждению*. В этом состоит одно из их основных отличий от процессов в неживых (косных) системах, которые подчиняются принципу *наименьшего принуждения* Г. Галилея. Выражения «*молекулярная машинерия*», «*молекулярная машина*» не являются метафорами. Ферменты и их сложные комплексы действительно обладают свойствами машин на наноуровне. В живой природе каждая молекулярная машина осуществляет свою *специфическую функцию*. Поэтому можно сказать, что, *как правило*, в биосистемах нет функции (или процесса) без молекулярной машины.

Репликация, транскрипция, трансляция, рекомбинация, репарация и становления мутаций и многие другие процессы в клетке являются чрезвычайно сложными процессами. Они не могут быть самопроизвольными. Они сопровождаются принудительным образованием (и/или разрывом) межмолекулярных ковалентных (и даже внутримолекулярных «слабых») связей. Для всех них необходимы молекулярные машины – ферменты и сложные их комплексы («фабрики» типа рибосом).

**Центральная догма молекулярной биологии** (Crick, 1958). Сейчас, когда мы достаточно осведомлены о невероятной сложности внутриклеточных процессов синтеза основных макромолекул, невозможность ни репликации, ни транскрипции, ни трансляции белков внутри клетки становится очевидной. Невозможность таких процессов и есть современная формулировка Центральной догмы. По существу, она – молекулярный и более четко сформулированный аналог постулата Вейсмана о ненаследовании приобретенных признаков (увечий).

**Принцип усилителя** (Тимофеев-Ресовский, Ромпе, 1959). В современных терминах его можно интерпретировать как запуск каскадного процесса: с одной копии гена синтезируется несколько молекул мРНК, по каждой из которых синтезируется много молекул фермента, каждая из которых способна бесчисленное число раз производить соответствующую биохимическую реакцию.

**Принцип конвариантной редупликации** (Тимофеев-Ресовский, 20-30 годы XX века): изменения гена способны к воспроизведению и закреплению в последующих поколениях. Без этого был бы невозможен естественный отбор. Этот принцип базируется на современных представлениях о **становлении мутаций как процессе**. Их предтечей явилась **физиологическая (паранекротическая) теория мутационного процесса** (Лобашев, 1947), нашедшая свое развитие в открытии систем репарации генетических повреждений. **В подавляющем большинстве случаев первичные (предмутационные) изменения ДНК мутагеном не способны реплицироваться как таковые. Поэтому за модификацией ДНК следует стадия становления мутации**, в ходе которой повреждение генетического материала превращается в наследуемое. И в этот процесс вовлечены механизмы репликации и генетической репарации.

**Определение мутации** – это такое искажение генетической программы, способность которого наследоваться обусловлена системами репликации, рекомбинации, репарации и расхождения хромосом (Хромов-Борисов, 1976). **Опосредованный мутагенез**: В соответствии с **Правилom принуждения к мутациям** могут приводить не только повреждения непосредственно ДНК, но и инактивация или модификация систем репликации, рекомбинации, репарации и расхождения хромосом. (Хромов-Борисов, 1976).

Проблема: не все мутагены являются канцерогенами, не все канцерогены являются мутагенами.

# ТЕРМОЦИКЛ - ДВИЖУЩАЯ СИЛА ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА И ОТБОРА БИОПОЛИМЕРОВ, БАЗОВАЯ ОСНОВА ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЖИЗНИ

С.Д. Варфоломеев

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН,  
Институт физико-химических основ функционирования сетей нейронов и  
искусственного интеллекта МГУ им. М.В.Ломоносова

Предложена модель, объясняющая природу предбиологического возникновения и эволюции макромолекул, основанная на термоцикле как движущей силе синтеза и комбинаторной селекции полимерных структур.

Предложенная концепция предбиологического зарождения и эволюции макромолекул объясняет феномен селекции макромолекул - драматического уменьшения вариантов структур макромолекул в процессе предбиологической эволюции, роль полимерных катализаторов, возникновение информационных молекул. Основой модели являются процессы поликонденсации трифункциональных мономеров в режиме термоцикла (циклического изменения температуры в области фазового перехода воды). Синтез полимерных молекул идёт в твёрдой фазе с участием супрамолекулярных взаимодействий мономеров с матрицей первично образованного полимера. Термоцикл обеспечивает термодинамические возможности протекания всех стадий процесса.

Рассмотрено несколько сценариев развития событий (эволюционно – сегрегационный, участие процессов гидролиза полимеров, возникновение катализаторов и автокаталитический процесс). Сделаны теоретические оценки времен эволюции при различных величинах параметра «конкурентного преимущества».

Проведена экспериментальная проверка предложенной кинетической теории путем исследования процессов синтеза пептидов из смесей противоположно заряженных аминокислот – (Asp, Lys), (Arg, Asp). Показано, что процессы абиогенного синтеза пептидов идут в относительно мягких температурных режимах, при этом синтезируется существенно меньше вариантов структур пептидов по сравнению с возможным статистическим набором. В процессе синтеза в твёрдой фазе происходит эволюция системы с исчезновением ряда наиболее неустойчивых пептидов. Проведение синтеза пептидов в режиме термоцикла показало, что при этом идёт селекционный процесс с образованием комплементарных цепей, что соответствует представлениям развитой кинетической теории.

Разработанные теоретические представления и полученные экспериментальные данные объясняют предбиологическую эволюцию макромолекул и феномен возникновения жизни на основе информационных макромолекул.

**РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА**

*С.А. Абдуллаев*<sup>1,2</sup>, *С.И. Глухов*<sup>2</sup>, *Д.В. Салеева*<sup>1</sup>, *Э.В. Евдокимовский*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия,

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия, [saabdullaev@gmail.com](mailto:saabdullaev@gmail.com)

**ROLE OF MITOCHONDRIAL DNA AND MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN THE DEVELOPMENT OF THE RADIATION-INDUCED RESPONSE OF THE ORGANISM**

*S.A. Abdullaev*<sup>1,2</sup>, *S.I. Glukhov*<sup>2</sup>, *D.V. Saleeva*<sup>1</sup>, *E.V. Evdokimovskii*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123098, Russia

<sup>2</sup> Institute of theoretica and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, 142290, Russia, e-mail: [saabdullaev@gmail.com](mailto:saabdullaev@gmail.com)

Благодаря современным успехам в области изучения митохондриального генома и применению новых методов, накоплены новые данные, которые позволяют понять механизмы пострadiационных нарушений митохондриальных функций и их роли в развитии лучевой реакции организма. На основе результатов многих исследований в настоящее время митохондриальной ДНК (мтДНК) и сами митохондрии рассматриваются как высокочувствительные мишени для ионизирующей радиации (ИР) и других повреждающих агентов. Поэтому избирательное воздействие на эти структуры может являться одним из подходов к снижению лучевой реакции организма, а также повышению эффективности радио- и химиотерапии опухолей. В последние годы наши исследования были связаны с изучением радиационно-индуцированных повреждений и мутаций мтДНК, аккумуляции и путей миграции мутантных фрагментов мтДНК в клетках, индукции окислительного стресса в тканях. Показана роль репарационных и антиоксидантных систем, процессов биогенеза, динамики и митофагии в поддержании функционально активных митохондрий в пострadiационный период, а также поиска митохондриально-нацеленных антиоксидантов, влияющих на репарацию ДНК.

Ранее нами было показано, что мтДНК в пострadiационный период может являться весьма динамичной молекулой. Показано, что выход фрагментов мтДНК из митохондрий сопровождается активацией синтеза в них новых копий мтДНК. Причем переход фрагментов мтДНК в цитозоль представляет собой активный перенос через проницаемые поры мембран митохондрий [1]. Поскольку в организме происходит постоянная гибель клеток и аутофагия митохондрий, внеклеточные фрагменты мтДНК или ее цельные молекулы обнаруживаются в плазме крови и в составе мочи животных и человека. Они представляют значительный интерес в качестве неинвазивных и высокочувствительных биомаркеров различных патологий. Однако, как было нами показано, после радиационного воздействия уровень фрагментов мтДНК в биологических жидкостях может быть гораздо выше [2]. Из литературы также известно, что молекулы мтДНК рассматриваются как генетически мобильные элементы, способные переходить из клетки в клетку [3]. Нами впервые было продемонстрировано также, что молекулы мтДНК, высвобождаемые из митохондрий в

пострадиационный период, будучи защищены от нуклеазной деградации, способны переходить в ядро клетки и встраиваться в ядерный геном [4]. Полученные экспериментальные данные указывают, что ионизирующая радиация, которая вызывает деструкцию мтДНК и двунитевые разрывы ядерной ДНК (ядНК) и активацию систем их репарации, можно рассматривать как важнейший агент, способный индуцировать формирование *de novo* numt-псевдогенов.

В последние годы радиобиологические исследования стали еще более актуальными в свете выявляемых радиационных рисков для экипажей длительных межпланетных миссий. Следует отметить, что несмотря на повышенные меры безопасности, в мире сохраняется потенциальная возможность радиационных аварий, террористических атак на радиационные объекты или взрывов «грязных радиационных бомб». При этом объектами большинства исследований были и остаются пролиферирующие клетки и ткани. Предполагалось, что постмитотические ткани, в том числе центральной нервной системы (ЦНС), являются достаточно радиорезистентными. Однако результаты ряда исследований, показывают, что ЦНС чрезвычайно уязвима к воздействию ИИ.

В нашей стране проводятся ограниченные исследования по изменению функциональных реакций ЦНС и когнитивной активности животных после воздействия ИИ. А исследований по изучению молекулярных механизмов повреждения генетических структур, путей их восстановления и сохранения активности после воздействия плотноионизирующих излучений – еще меньше. Поэтому, дальнейшие исследования молекулярных и клеточных механизмов радиационного повреждения структур головного мозга остаются достаточно актуальной проблемой. Развитие этих исследований востребовано в связи с широким использованием ИИ в терапии опухолей мозга. Отсутствие достаточных знаний по воздействию космической радиации, в которой протоны занимают более 80% излучения глубокого космоса, на здоровье космонавтов, представляется ограничивающим фактором для космических миссий за пределы околоземной орбиты.

Недавно нами были изучены структурно-функциональные характеристики митохондрий и их генетического аппарата в клетках разных структур центральной нервной системы млекопитающих, подвергнутых редко- и плотноионизирующими излучениями [5, 6]. Показано, что репарация повреждений яДНК в разных областях головного мозга происходит медленно в течение 24 часов; в гиппокампе репарация яДНК происходит гораздо медленнее, чем в остальных регионах мозга. Количество копий мтДНК в трех областях мозга крыс увеличивается с одновременным повышением уровня их гетероплазмии. Однако через 24 часа после облучения количество мутантных копий мтДНК в гиппокампе значительно выше, чем в клетках коры и мозжечка. В регионах мозга облученных крыс происходит снижение экспрессии генов (*ND2*, *CytB*, *ATP5O*), участвующих в синтезе АТФ, и повышение транскриптов генов, регулирующих биогенез митохондрий (*TFAM*, *PGC-1 $\alpha$* ). С другой стороны, анализ генов, контролирующую динамику митохондрий (*MFN1*, *FIS1*), показал их резкое снижение только в гиппокампе. В связи с этим можно полагать, что повышенный уровень гетероплазмии мтДНК приводит к нарушению работы комплексов окислительного фосфорилирования и генерации повышенного уровня активных форм кислорода и азота в митохондриях, вызывающих дополнительные повреждения яДНК. Снижение экспрессии ядерных генов, регулирующих динамику митохондрий, в свою очередь, способствует снижению элиминации дисфункциональных органелл из тканей мозга. И больше всего это снижение отражалось на структурно-функциональных характеристиках гиппокампа облученных крыс.



Усиление отсроченного окислительного стресса в облученных клетках может вызвать повреждения ядерного генома в облученных клетках и инициировать его нестабильность [7], которая играет ключевую роль в индукции канцерогенеза и нейродегенеративных нарушений. Поэтому результаты этих исследований подтолкнули нас на поиски митохондриально-направленных антиоксидантов способствующие предотвращению развития отдаленных последствий радиационного повреждения.

В связи с установлением роли митохондриальной ДНК и функций митохондрий в развитии радиационного ответа организма, возникла необходимость адресной доставки антиоксидантов в митохондрии для снижения радиационно-индуцированных повреждений клеток. В этом направлении исследования развиваются с использованием следующих групп соединений: а) конъюгированных с липофильными катионами и проникающих в митохондрии; б) активирующих митофагию – селективное удаление поврежденных органелл; в) соединений-активаторов АМР-зависимой протеинкиназы, для усиления биогенеза митохондрий. Усиление биогенеза митохондрий способствует активации динамики этих органелл и их митофагии. Однако, имеются защитные соединения, способные преодолевать митохондриальный барьер без связки с липофильными катионами. К ним можно отнести метформин и мелатонин препараты, давно используемые в клинической практике. Как было показано, указанные группы соединений способны проявлять радиопротекторные и радиомитигаторные свойства [8, 9].

#### Список литературы

1. Patrushev M., Kasumov V., Patrusheva V. et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. P. 3100-3103.
2. Abdullaev S.A, Minkabirova G.M., Bezlepkin V.G., Gaziev A.I. Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation. // *Radiation and Environmental Biophysics*, 2015. V. 54. P. 297-304.
3. Spees J.L., Olson S.D., Whitney M.J., Prockop D.J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 1283-1288.
4. Abdullaev S.A., Gaziev A.I. Experimental detection of mitochondrial DNA insertions in nuclear genome of chicken embryos developed from X-ray irradiated eggs. // *Journal of Genetics and Genome Research*, 2014. 1:008.
5. Abdullaev S.A., Gubina N.E., Bulanova T.S., Gaziev A.I. Assessment of nuclear and mitochondrial DNA, expression of mitochondria-related genes in different brain regions in rats after whole-body X-ray irradiation. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21:1196.
6. Abdullaev S., Bulanova T., Timoshenko G., Gaziev A.I. Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons. // *Molecular Biology Reports*, 2020, V. 47. P. 4815-4820.
7. Kim G.J., Fiskum G.M., W.F. Morgan. A Role for mitochondrial dysfunction in perpetuating radiation induced genomic instability. // *Cancer Research*. 2006. V. 66. № 21. P. 10377-10383.
8. Abdullaev S., Minkabirova G., Karmanova E., Bruskov V., Gaziev A. Metformin prolongs survival rate in mice and causes increased urinary excretion of cell-free DNA in X-irradiated rats. // *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2018. V. 831. P. 13-18.
9. Abdullaev S., Glukhov S.I., Gaziev A.I. Radioprotective and radiomitigative effects of melatonin in tissues with different proliferative activity. // *Antioxidants*, 2021. 10. 1885.

## **ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ МИКРОЯДЕР В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ В ОСТРОМ ЛУЧЕВОМ ПЕРИОДЕ**

*О.С. Аксёненко, А.Е. Сусленкова, Е.А. Щурова, Н.Н. Веялкина*

Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Беларусь

E-mail: [suslenkova.alina@gmail.com](mailto:suslenkova.alina@gmail.com)

*Резюме.* Исследовано влияние однократного общего рентгеновского облучения на динамику показателей пролиферативной активности и уровня клеток с микроядрами в костном мозге мышей линии C57Bl/6 в остром постлучевом периоде. Рентгеновское излучение высокой мощности в дозе 3Гр не вызывает гибели животных, но влияет на состояние гемопоэтических клеток костного мозга мышей. Эффекты, наблюдаемые на первые и третьи сутки после облучения, снижают свою выраженность к седьмым суткам.

*Ключевые слова:* рентгеновское облучение, цитометрия, микроядра, пролиферативная активность.

## **DYNAMICS OF PROLIFERATIVE ACTIVITY AND LEVEL OF MICRONUCLEI IN MICE BONE MARROW CELLS IN THE ACUTE RADIATION PERIOD**

*O. Aksenenko, A. Suslenkova, E. Shchurova, N.Veyalkina*

Institute of Radiobiology of NAS of Belarus, Gomel, Belarus

E-mail: [suslenkova.alina@gmail.com](mailto:suslenkova.alina@gmail.com)

*Summary.* The effect of a single total X-ray irradiation on the dynamics of proliferative activity and the level of cells with micronuclei in the bone marrow of C57Bl/6 mice in the acute post-radiation period was studied. X-ray radiation of high power at a dose of 3 Gy does not cause the death of animals, but affects the state of hematopoietic cells in the bone marrow of mice. The effects observed on the first and third days after irradiation decrease their severity by the seventh day.

*Keywords:* X-ray irradiation, cytometry, micronuclei, proliferative activity

**Введение.** Влияние ионизирующего излучения на организм человека неуклонно растет от проведения медицинских диагностических и терапевтических процедур при лучевой терапии онкологических заболеваний, также сохраняется опасность сверхнормативного облучения персонала и населения в случае аварийных ситуаций. Что делает актуальным исследование радиационно-индуцированных эффектов и поиск средств снижения повреждающего действия ионизирующего излучения. Ионизирующее излучение в высоких дозах вызывает повреждение многих органов, особенно органов с высокой пролиферацией клеток, таких как костный мозг и желудочно-кишечный тракт. Радиационное повреждение костного мозга приводит к дозозависимому острому истощению стволовых клеток и клеток-предшественников всех клеточных линий, оказывая влияние на их пролиферативную активность, а также проявляя генотоксическое действия [1, 2]. Направленность данных изменений зависит от многих факторов, в том числе, от дозы и режима облучения [3]. Исследование клеток костного мозга после воздействия ионизирующего излучения имеет важное значение для понимания реакции клеток на лучевое повреждение и генотоксических эффектов на разных этапах постлучевого периода.

**Цель исследования.** Изучить влияние однократного общего рентгеновского облучения в дозе 3Гр на динамику показателей пролиферативной активности и уровня клеток с микроядрами в костном мозге мышей линии С57В1/6 в остром постлучевом периоде.

**Материалы и методы исследований.** Эксперименты проведены на лабораторных мышках линии С57В1/6 обоего пола в возрасте 2,5-3 месяца. Каждая группа состояла из 5 самок и 5 самцов. Животных содержали в условиях стационарного вивария Института радиобиологии НАН Беларуси, согласно установленным нормам. Все манипуляции с лабораторными животными в эксперименте выполнялись в соответствии с международными рекомендациями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Мышей подвергали общему однократному облучению в дозе 3Гр с помощью рентгеновской установки биологического назначения X-Rad 320 Precision X-ray Inc (мощность дозы 98,8 сГр/мин).

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-е и 7-е сутки после облучения на фоне эфирного наркоза путем декапитации, немедленно проводилось вскрытие животных и выделение клеток костного мозга.

Анализ пролиферативной активности клеток костного мозга и уровня клеток с микроядрами в костном мозге проводили методами проточной цитометрии при помощи цитофлюориметра Cytomics FC 500, Beckman Coulter при длине волны 488 нм, с использованием красителей пропидиум йодид и этидиум бромид.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием пакета прикладных программ «IBM SPSS Statistics 22». Результаты анализа считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты исследований.**

При однократном общем облучении лабораторных мышей рентгеновским излучением высокой мощности в дозе 3Гр гибели и изменения общего состояния животных не наблюдалось. Но данная доза облучения значительно влияет на митотически-активные клетки организма животных.

На всех сроках наблюдения отмечено повышение уровня клеток с микроядрами, начиная с первых суток до  $2,13 \pm 0,42\%$  ( $p < 0,01$ ) при  $0,76 \pm 0,095\%$  в контрольной группе. На третьи сутки данный показатель составил  $4,42 \pm 0,95\%$ , а к седьмым снизился до  $2,37 \pm 0,59\%$  ( $p < 0,01$ ).

Наиболее значимые изменения митотической активности клеток костного мозга мышей отмечались на первые сутки – повышение доли клеток на стадии митоза до  $16,34 \pm 1,35\%$  при  $6,12 \pm 0,81\%$  в контроле, на третьи сутки после облучения количество митотических клеток в среднем составило  $10,64 \pm 0,72\%$  ( $p < 0,01$ ). Так же через сутки после облучения наблюдалось снижение содержания клеток на стадии G0 до  $60,03 \pm 1,10\%$  при  $67,25 \pm 2,13\%$  в контроле, в последующие сроки наблюдения отмечалось повышение данного показателя.

Таким образом, рентгеновское излучение в дозе 3Гр ( $0,98\text{Гр/мин}$ ) существенно влияет на кинетику дифференцировки и пролиферации клеток костного мозга мышей и проявляет значимый генотоксический эффект. Эффекты, наблюдаемые на первые и третьи сутки после облучения, снижают свою выраженность к седьмым суткам, что свидетельствует о начале восстановления процессов кроветворения. Клетки костного мозга являются одними из наиболее радиочувствительных, и их реакция является чувствительным биомаркером влияния ионизирующего излучения и может быть использована для оценки адаптивных возможностей организма и при исследовании новых радиопротекторных средств.

### **Литература.**

1. Bannister L.A., Mantha R.R., Devantier Y., Petoukhov E.S., Brideau C.L., Serran M.L., Klokov D.Y. Dose and Radioadaptive Response Analysis of Micronucleus Induction in Mouse Bone Marrow. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – N 17. – P 1548.
2. Hei TK, Zhou H, Chai Y, Ponnaiya B, Ivanov VN. Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. // *Current molecular pharmacology.* – 2011. – N 4. – P. 96–105.
3. Chua HL, Plett PA, Sampson CH, Joshi M, Tabbey R, Katz BP, MacVittie TJ, Orschell CM. Long-term hematopoietic stem cell damage in a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. // *Health Phys.* – 2012. – N 103. – P. 356-66.

**ИНДУКЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ  
В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ  
НИЗКИМИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ДОЗАМИ ПРОТОНОВ И ИОНОВ  
УГЛЕРОДА С РАЗНЫМИ ЛПЭ**

*Т.А. Белякова<sup>1</sup>, О.М. Розанова<sup>2</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>2</sup>, Н.С. Стрельникова<sup>1</sup>,  
А.Г. Васильева<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П. Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

<sup>3</sup> Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия  
e-mail: [belyakovatanya@mail.ru](mailto:belyakovatanya@mail.ru)

*Резюме.* Исследовалось на мышах SHK влияние низких и средних доз облучения протонами и ускоренными ионами углерода в зависимости от ЛПЭ на уровень цитогенетических повреждений в клетках костного мозга. Было показано, что величина ОБЭ для протонов до пика Брэгга равнялась 0,9, а в пике 1.15; для углеродного пучка значение ОБЭ до пика составило 0,9, в пике шириной 10 мм – в диапазоне 1.1–1.7, а для пика шириной 30 мм было 1–1.3. Наибольшее значение ОБЭ было получено при облучении мышей ионами углерода пике Брэгга шириной 10 мм в области малых доз.

*Ключевые слова:* ионы углерода, протоны, пик Брэгга, ОБЭ, ЛПЭ, микродрра, мышши

**INDUCTION OF CYTOGENETIC DAMAGES IN BONE MARROW CELLS  
UNDER IRRADIATION OF MICE WITH LOW AND THERAPEUTIC DOSES OF  
PROTONS AND CARBON IONS**

*T.A. Belyakova<sup>1</sup>, O. M. Rozanova<sup>2</sup>, E. N. Smirnova<sup>2</sup>, N. S. Strelnikova<sup>1</sup>,  
A.G. Vasilyeva<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Branch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Protvino, Russia

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia

<sup>3</sup> Institute for High Energy Physics named by A.A. Logunov of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Protvino, Russia  
e-mail: [belyakovatanya@mail.ru](mailto:belyakovatanya@mail.ru)

*Summary.* The effect of exposure to protons and accelerated carbon ions at low and medium doses on the level of cytogenetic damage in bone marrow cells depending on LET was studied in experiments on SHK mice. The results of experiments show that the RBE for protons up to the Bragg peak was 0.9, and at the peak – 1.15. The RBE for carbon ions up to the peak was 0.9, and in the 10 mm Bragg peak, the value was in the range of 1.1–1.7; for the 30 mm Bragg peak, it was 1–1.3. The highest RBE value was obtained in the region of low doses when mice were irradiated at the 10 mm Bragg peak.

*Key words:* carbon ions, proton, Bragg peak, RBE, LET, micronucleus, mice

Изучение биологической эффективности заряженных частиц высоких энергий в области низких и средних доз при облучении животных является актуальным для решения проблем ядерной медицины и космической биологии, а также для понимания фундаментальных механизмов развития цито- и генотоксических эффектов. Применение пучков ионов и протонов в онкологии дает огромное преимущество перед фотонной терапией из-за особенностей прохождения ионов через ткани организма. Это

связано с физическими свойствами заряженных частиц: из-за кулоновского взаимодействия ионы оставляют небольшую дозу во входной части (плато) кривой Брэгга и достигает максимума в конце пробега (пик Брэгга) [1]. Одной из приоритетных задач радиобиологии частиц высоких энергий является определение значений относительной биологической эффективности (ОБЭ). Показано, что величина ОБЭ зависит как от биологических параметров: вида, пола, возраста животного, концентрации кислорода в тканях, стадии клеточного цикла, условий культивирования *in vitro* и метаболизма *in vivo*, так и от физико-технических характеристик облучения: способа доставки и расчета дозы, величины линейной потери энергии (ЛПЭ) частиц, состава и однородности пучка частиц и вторичного излучения [2]. Особенности биологического действия ионов с высоким ЛПЭ по сравнению с фотонным излучением, в основном, обусловлены меньшей зависимостью от кислородного эффекта и стадий клеточного цикла, что делает применение заряженных частиц перспективным для лечения радиорезистентных опухолей. В связи с ограниченностью числа установок протонной и ионной терапии в нашей стране нет систематических исследований последствий адронной терапии на животных. На базах ФТЦ ФИАН (г. Протвино) и - НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ (г. Протвино) разрабатываются и эксплуатируются в рамках научно-исследовательских мероприятий комплекс протонной терапии «Прометеус» и «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70», что предоставляет возможность проведения физических и биологических экспериментов.

Цель: исследование действия протонов и ионов углерода в разных областях кривой Брэгга в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге при тотальном облучении мышей *in vivo* относительно рентгеновского излучения (РИ).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных мышей колонии SHK (31–35 г), которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Россия). Эксперименты были одобрены Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биотехнике (№ 26 от 09.02.2021). Облучение мышей проводилось в двух областях кривой Брэгга – до пика и в пике в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр. Анестезированные золетил-ксилазиновым наркозом мыши помещались в поле облучения с точностью позиционирования до 1 мм. Облучение протонами осуществлялось на протонном синхротроне ФТЦ ФИАН (г. Протвино) с применением технологии сканирования карандашным пучком с одного направления. Энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 90–116 МэВ. Среднее значение ЛПЭ в пике составляло  $2.5 \pm 0.7$  кэВ/мкм. При облучении до пика Брэгга было сформировано однородное дозовое поле прямоугольной формы размером 40x70 мм. Энергия частиц составляла 170 МэВ, что соответствует ЛПЭ на плато  $0.7 \pm 0.04$  кэВ/мкм. Контролировали дозу клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (ЕВТ2, США). Облучение животных ионами углерода проводилось на моноэнергетическом пучке ускорительного комплекса У-70 НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ (г. Протвино) в водном фантоме. Энергия пучка на выходе ускорителя составляла 450 МэВ/нуклон. Для облучения мышей в пике Брэгга использовались две ширины пика: 10 мм и 30 мм. Животные облучались до пика Брэгга в фантоме на глубине 8–11 см, при этом все тело мыши облучалось равномерно. Величина ЛПЭ ионов углерода составляла при облучении до пика Брэгга 15 кэВ/мкм, в пике Брэгга 10 мм – 100 кэВ/мкм, а в пике 30 мм – 39 кэВ/мкм. Профили пучка и равномерность поперечного облучения контролировали с помощью радиохромной плёнки ЕВТ-3 (CafChromic, США). Мышей из группы положительного контроля облучали рентгеновским излучением (РИ) на

установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин) в тех же дозах и условиях (ЦКП “Источники излучения” ИБК, Пушкино). В каждом эксперименте был контроль, учитывающий транспортировку, наркотизацию и имитацию облучения животных. Через 28 ч после облучения готовили цитогенетические препараты по стандартной методике и определяли процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в костном мозге мышей. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия  $U$  Манна–Уитни. Вероятность ошибки  $p \leq 0.05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий.

Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что уровень ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей при всех дозах протонного излучения в пике Брэгга был близок к РИ, при облучении протонами до пика выход ПХЭ с МЯ был значимо ниже, чем при РИ ( $p \leq 0.05$ ). Количество ПХЭ с МЯ при облучении мышей в пике Брэгга шириной 10 мм в дозе 0.2 Гр резко увеличивается по сравнению с 0.1 Гр, это может быть связано с эффектом гиперчувствительности в области малых доз. Частота выхода ПХЭ с МЯ при облучении мышей в пике шириной 10 мм в дозах 0.2 Гр и 1.5 Гр отличалось от выхода ПХЭ при РИ в тех же дозах, а при облучении в пике шириной 30 мм только при дозе 1.5 Гр наблюдалось статистически значимое отличие ( $p \leq 0.05$ ). Отличие выхода ПХЭ с МЯ при облучении ионами углерода до пика Брэгга относительно рентгеновского излучения наблюдалось только при дозе 0.5 Гр ( $p \leq 0.05$ ). Дозовые зависимости % ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга мышей во всех группах облучения имели линейный характер и были получены уравнения доза-эффект: для РИ:  $y = 0.6 + 3.7x$ ; для протонов в пике Брэгга:  $y = 0.9 + 3.8x$ ; а до пика Брэгга:  $y = 0.3 + 2.8x$ ; для ионов углерода в пике 10 мм:  $y = 0.9 + 4.5x$ ; в пике 30 мм:  $y = 0.4 + 4.5x$ , а до пика:  $y = 0.6 + 3.3x$ , где  $y$  – % ПХЭ с МЯ,  $x$  – доза облучения, Гр. Коэффициент ОБЭ протонов в пике Брэгга (ЛПЭ ~ 2.5 кэВ/мкм), определенный по равноэффективным дозам, равнялся 1.15, ОБЭ протонов до пика Брэгга – 0.55 (ЛПЭ ~ 0.7 кэВ/мкм). Величина ОБЭ оказалась близка к значениям, определенным в этом же диапазоне доз для протонных пучков других энергий и конфигураций, полученных на культурах клеток или другими методами [3, 4]. Величина ОБЭ для углеродного пучка, рассчитанная по значениям цитогенетических нарушений при равноэффективных дозах, для пика 10 мм была максимальной 1.7 при дозе 0.2 Гр, а минимальной 1.1 в дозе 1 Гр, а для пика 30 мм в области малых доз 0.1–1 Гр составила 1. При дозе 1.5 Гр ОБЭ не зависела от ширины пика и равнялась 1.3–1.4. Показано, что уменьшение в три раза ширины пика и, соответственно, существенное отличие в значении ЛПЭ частиц (39 кэВ/мкм и 100 кэВ/мкм) увеличивает величину ОБЭ только в области малых доз. Значение ОБЭ при облучении мышей ионами углерода до пика Брэгга (ЛПЭ ~ 15 кэВ/мкм) в области малых и средних доз была 0.9.

Заключение. Таким образом, мы показали с помощью МЯ-теста на клетках костного мозга, что значения ОБЭ протонов и ионов углерода при облучении мышей в диапазоне низких и средних доз по-разному зависят от величины дозы и ЛПЭ.

#### Список литературы

1. Paganetti H., Blakely E., Carabe-Fernandez A., et al. *Medical Physics*. 2019;46(3):53–78.
2. Tsujii H., Kamada T., Shirai T., Noda K., Tsuji H., Karasawa K. *Carbon-Ion Radiotherapy Principles, Practices, and Treatment Planning*. Springer Tokyo. Japan 2014;312
3. Tommansino F., Durante M. *Cancers*. 2015;7:353–381.
4. Calugaru V., Nauraye C., Noel G., Giocanti, N., et al. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011;81(4):1136–1143.

## **СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТИЯ В ВИДЕ СВОБОДНОЙ ТРИТИЕВОЙ ВОДЫ И ВНЕШНЕГО $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ. ПЕРИОДЫ ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ ТРИТИЯ ИЗ ОРГАНИЗМА И РАСЧЕТ ПОГЛОЩЕННЫХ ДОЗ**

*Л.Г. Бондарева*

Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Мытищи, Россия  
e-mail: [lydiabondareva@gmail.com](mailto:lydiabondareva@gmail.com)

*Резюме.* В экспериментах на крысах изучена принципиальная возможность включения из НТО в ДНК тканей, которое является следствием метаболических путей водорода в организме. Установлено, что воздействие НТО при однократном или длительном его введении приводит к большему структурному и функциональному поражению генетического аппарата клеток тканей животных, чем действие адекватного по формированию мощности дозы  $\gamma$ -излучения. Рассчитаны периоды полувыведения из органов и поглощенные дозы.

*Ключевые слова:* тритий, радиационное воздействие,  $\gamma$ -излучение, ДНК, крысы

## **COMPARISON OF THE BIOLOGICAL ACTION OF TRITIUM IN THE FORM OF FREE TRITIUM WATER AND EXTERNAL $\gamma$ -IRRADIATION. TRITIUM HALF-LIFE FROM THE BODY AND CALCULATION OF ABSORBED DOSES**

*L. G. Bondareva*

Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytischki, Russia  
e-mail: [lydiabondareva@gmail.com](mailto:lydiabondareva@gmail.com)

*Summary.* In experiments on rats, we studied the fundamental possibility of incorporation from HTR into tissue DNA, which is a consequence of the metabolic pathways of hydrogen in the body. It was found that the impact of NTO with a single or long-term administration of it leads to a greater structural and functional damage to the genetic apparatus of animal cells than the action of an adequate dose rate of  $\gamma$ -radiation. Organ half-lives and absorbed doses were calculated.

*Keywords:* tritium, radiation exposure,  $\gamma$ -radiation, DNA, rats

Тритий ( $^3\text{H}$ ), радиоактивный изотоп водорода, является одним из основных побочных продуктов ядерной промышленности, попадающих в окружающую среду. Тритий превращается в стабильный изотоп гелия путем  $\beta$ -распада, излучая низкоэнергетический электрон со средней энергией 5,7 кэВ и частицу антинейтрино. В среднем длина пробега  $\beta$ -частицы, испускаемой тритием, составляет всего 0,4–0,6 мкм, что значительно меньше диаметра ядра соматической клетки [1]. Таким образом, тритий представляет опасность для здоровья человека только при поступлении в организм. В качестве изотопа водорода тритий входит в состав молекул воды (оксид трития – НТО), неорганических и органических молекул (органически связанный тритий – ОСТ). При широкой распространенности и высокой тенденции к накоплению техногенного трития в биосфере существует интерес к биологическому действию оксида трития.

Целью работы явилось сравнить действие трития с внешним гамма-излучением во времени (время-эффект) для сопоставления уровней повреждения и восстановления при этих видах изучения и рассчитать периоды полувыведения из органов и поглощенные дозы, на примере крыс.

Экспериментальные исследования проведены на крысах-самцах линии Wistar (Аутбредные), которые любезно предоставлены сотрудниками Красноярского



государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, с начальной массой 140-150 г. Воду, содержащую тритий, вводили однократно внутривентрикулярно через металлический зонд животным 7 групп в количестве 1,1; 3,3; 5,5; 9,0; 14,0; 30,0 и 44,4 МБк/г массы. После окончания эксперимента крысы каждой группы были препарированы. При сравнении действия трития в внешнем гамма-излучении использовали две группы крыс (по 30 особей каждая). Полученные ткани были подвергнуты подготовке к необходимым исследованиям, по аналогии и согласно описанию, приведенному в работе [2].

Измерение радиоактивности в мягких тканях и крови показало довольно равномерное распределение трития, в интервале от  $49 \cdot 10^4$  Бк/мл (селезенка) до  $70 \cdot 10^4$  Бк/мл (желудок).

Одни и те же сроки исследования после введения НТО концентрация трития в тканях животных сохраняли хорошую пропорциональность введенному количеству радионуклида. Радиометрию крови проводили ежесуточно в течение месяца. Полученные закономерности поведения трития использовались для расчета концентрации трития и поглощенных доз у животных всех исследуемых групп.

Периоды полувыведения трития ( $T_{1/2}$ ) для разных тканей составили следующие значения (сутки): кровь – 3,49; костный мозг – 4,30; селезенка – 4,15; тимус – 3,79; печень – 3,99; почки – 3,65.

Рассчитаны значения суммарных радиационных доз после однократного введения НТО в разных количествах. Установлено, что в течение первых 4 суток накапливается ~ 50 % от всей дозы, 86 % - за 10 суток, 93 % - за 14 суток и 99,5 % - за 1 месяц после введения НТО. Эти результаты, представленные по крови, так как кровь является репрезентативной для заключения о дозовых нагрузках в мягких тканях и организме после введения НТО, а ее ежесуточная радиометрия обеспечивала хорошую дозиметрию. 30-ти суточная выживаемость изучена в двух группах животных, получивших тритий в количестве 30 и 44,4 МБк/г массы (поглощенные дозы за месяц 12,8-18,9 Гр). При введении 44,4 МБк/г массы все животные погибали через 22 суток,  $CD_{50}$  рассчитанная на основании кривой доза-эффект, составила  $9,97 \pm 1,45$  Гр.

Сравнительное изучение действия трития с внешним  $\gamma$ -излучением во времени (время-эффект) позволяет сопоставить различия в характере повреждения и восстановления на разных уровнях биологической организации при этих водах излучения. Такие данные необходимы для понимания основных механизмов, определяющих большее повреждающее действие трития по сравнению с  $\gamma$ -излучением. Для получения этих данных, животных сравнимой группы облучали на  $\gamma$ -установке  $^{137}\text{Cs}$  с падающей мощностью дозы, имитирующей воздействие НТО.

При однократном введении оксида трития в количестве 22 МБк/г массы тела (1-я группа животных) и соответствующая по формированию дозы внешнее  $\gamma$ -облучение (2-я группа) создавали практически однотипные суточные и суммарные дозы. Суммарная доза на организм в эксперименте: - воздействие оксида трития –  $7,9 \pm 0,4$  Гр, воздействие  $\gamma$  – квантов –  $8,0 \pm 0,5$  Гр. В первой группе первый случай гибели крысы зафиксирован через 3 месяца после воздействия. Во второй группе – через 5 месяцев. До 50 % гибели крыс зафиксирован через 9 месяцев в первой группе и 50 % гибели крыс зафиксирован через 11 месяцев во второй группе. Продолжительность жизни крыс 1-й и 2-й группы была сокращена на 38 % и 14 % по сравнению с контролем.

Интегральные показатели изменения структуры ДНК двух групп животных в отдельные периоды исследования показали, что на скорость включения трития в организм и характер его распределения может существенно влиять внешнее  $\gamma$ -излучение.

Согласно нашим данным с увеличением дозы внешнего  $\gamma$ -облучения  $^{137}\text{Cs}$  (с 1 до 35 Зв/ч) замедляется включение трития в органические структуры (с 21 до 15 % от общего количества трития), наблюдается более медленное выведение трития и продуктов распада из организма (с  $T_{1/2} \sim 85$  сут до  $T_{1/2} \sim 135$  сут).

С увеличением дозы скорость включения трития из воды в белки падает, а скорость его перехода из белков в жиры и из жиров в воду возрастает.

Основное различие воздействия НТО и внешнего  $\gamma$ -излучения, проявляющегося как при однократном, так и при длительном поступлении радионуклида, это инициация синтеза ДНК при воздействии НТО и ингибирование биосинтеза при  $\gamma$ -излучении.

Литература:

1. Alloni D., Cutaia C., Mariotti L. et. al. Radiat. Res. 2014. Vol. 182. P. 322–330.
2. Bondareva L. Tritium in the freshwater ecosystem of the Yenisei River: behavior, accumulation, and transformation. In book: Tritium: Advance in Research and Application/ by ed. Jankovic. Nova Science Publishers. - Inc. New York, 2018. - p. 47-98.

## РАДИАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И УСКОРЕННЫЕ ТЯЖЕЛЫЕ ИОНЫ

*А.В. Борейко*

Лаборатория радиационной биологии Объединенного института ядерных исследований, Дубна, Россия

e-mail: [albor@jinr.ru](mailto:albor@jinr.ru)

*Резюме.* Проведен анализ результатов экспериментальных исследований мутагенного действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на бактерии и клетки млекопитающих. Показано, что моноэнергетичные пучки ускоренных тяжёлых ионов являются эффективным инструментом установления механизмов образования генных и структурных мутаций у клеток с различным генотипом.

*Ключевые слова:* генные и структурные мутации, ускоренные тяжёлые ионы, повреждения ДНК.

## RADIATION MUTAGENESIS AND ACCELERATED HEAVY IONS

*A.V. Boreyko*

Radiation Biology Laboratory of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

e-mail: [albor@jinr.ru](mailto:albor@jinr.ru)

*Summary.* An analysis of the results of experimental studies of the mutagenic effect of ionizing radiation with different physical characteristics on bacteria and mammalian cells has been carried out. It has been shown that monoenergetic beams of accelerated heavy ions are an effective tool for establishing the mechanisms for formation of gene and structural mutations in cells with different genotypes.

*Key words:* gene and structural mutations, accelerated heavy ions, DNA damage.

Уже в первые десятилетия прошлого века стало ясно, что ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками являются эффективным инструментом при выяснении механизмов действия излучения на живые клетки и, прежде всего, механизмов радиационного мутагенеза. Со всей определённой на это указывали классики радиационной генетики. Н.В. Тимофеев-Ресовский отмечал: «Опыты с излучениями разных мощностей дозы и разной жесткости позволили в значительной мере конкретизировать то физическое явление, которое служит физическим механизмом, вызывающим мутации...». Открытие структуры ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком семьдесят лет назад революционизировало не только мутационные исследования, но и всю генетику и почти всю биологию. Вместе с тем потребовалось несколько лет, чтобы двойная спираль стала общепризнанной как истинная структура генетического материала. С принятием предложенной модели гена, центральная проблема мутагенеза была решена раз и навсегда. Открытие молекулярной структуры гена позволило конкретизировать характер молекулярных нарушений, возникающих при облучении живых клеток и являющихся основой формирования мутаций. Однако однозначная связь конкретных молекулярных нарушений структуры ДНК, таких как одонитевые разрывы нити ДНК, модифицированные основания, с их проявлением в виде закреплённой мутации не находила подкрепления. Это обстоятельство позволило рассматривать определённые повреждения ДНК как «премутационные» и прийти к выводу о вероятностном характере закрепления повреждения в генетической структуре в виде мутации.

Среди широкого спектра радиационных повреждений ДНК (нарушения сахарофосфатного остова, модификации оснований, разного рода шивки и т. д) позднее были идентифицированы «кластерные повреждения». Такого рода нарушения структуры включают в себя несколько соседних «одиночных» повреждений ДНК в одной или

двух оппозитных нитях ДНК. С увеличением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучений возрастает выход таких повреждений, формирующихся вдоль трека заряженных частиц. Возрастает и количество генных и структурных мутаций в облученных клетках. Это обстоятельство позволило прийти к выводу о важной роли кластерных повреждений ДНК в индуцированном мутационном процессе. С использованием пучков ускоренных заряженных частиц, генерируемых ускорителями тяжёлых ионов в ОИЯИ, были изучены закономерности формирования генных и структурных мутаций в клетках микроорганизмов, млекопитающих и человека в широком диапазоне ЛПЭ. С применением методов микродозиметрии было установлено, что выход (G) различных комбинаций повреждений, входящих в кластерные нарушения структуры одной или оппозитных участков двух нитей ДНК, возрастает с увеличением ЛПЭ частиц, достигая максимальных значений [1]. При этом, положение максимума на зависимости G(ЛПЭ) для различных типов кластерных повреждений не является инвариантным. Для «однонитевых» кластерных повреждений их максимальный выход выявляется в области ЛПЭ частиц значительно меньших по сравнению с «двунитевыми» повреждениями. С учетом этих обстоятельств были изучены закономерности формирования генных и структурных мутаций у бактерий в широком диапазоне ЛПЭ. Было установлено, что закономерности индукции генных и структурных мутаций в клетках бактерий при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ, различны [2]. Это обусловлено различием в характере радиационных повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс: кластерных однонитевых разрывов и двунитевых разрывов ДНК при формировании генных и структурных мутаций, соответственно. Показано, что дозовые зависимости частоты образования генных мутаций при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжёлых ионов описываются линейно-квадратичными функциями, для структурных мутаций характерны линейные зависимости «доза-эффект». Квадратичный характер дозовых кривых мутагенеза обусловлен «взаимодействием» двух независимых друг от друга событий «попадания» в ходе SOS-репарации повреждений генетических структур. Сделан вывод о том, что при действии ускоренных тяжёлых ионов генные мутации индуцируются областью  $\delta$ -электронов треков заряженных частиц. Методами SOS-хромотеста, SOS-люкс-теста и индукции профага  $\lambda$  изучены закономерности SOS-ответа клеток при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ [3, 4]. На основании полученных данных с использованием тяжёлых ионов сделан вывод о том, что молекулярной основой формирования генных мутаций являются кластерные однонитевые разрывы ДНК, структурных мутаций – двунитевые разрывы ДНК. Выявлено, что зависимость относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных ионов от их ЛПЭ описывается кривыми с локальным максимумом. Показано, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с различным генотипом, оцениваемая по летальному действию, индукции генных и структурных мутаций, детерминирована особенностями передачи энергии излучений, влияющими на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации клеток. Возрастание относительной биологической эффективности тяжелых заряженных частиц обусловлено увеличением выхода повреждений ДНК, участвующих в формировании радиационно-индуцированных эффектов, и повышением эффективности индуцибельных систем репарации. Установлено, что величина ЛПЭ ( $L_{max}$ ), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ по использованным критериям облучения, варьирует в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного эффекта. Показано, что для генных мутаций значения  $L_{max}$  реализуются в области ЛПЭ, равных  $\approx 20$  кэВ/мкм. Для летальных эффектов

облучения и индукции делеционных мутаций величина  $L_{\max}$  составляет  $\approx 50$  и  $100$  кэВ/мкм, соответственно. Различия в положении  $L_{\max}$  для изученных радиационно-генетических эффектов определяются различным типом повреждений ДНК, участвующих в мутационном процессе [2].

Исследования мутагенных эффектов облучения клеток млекопитающих и человека тяжёлыми заряженными частицами также выявили высокую биологическую эффективность ускоренных многозарядных ионов [5]. Были изучены закономерности индукции разными типами излучений нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций в клетках человека. При исследовании стабильных хромосомных aberrаций были использованы ДНК-пробы, специфичные для хромосом 1 и 2 лимфоцитов человека. С применением FISH-техники выявлена высокая частота образования стабильных aberrаций хромосом, таких как транслокации.

Как уже указывалось, характер передачи энергии тяжёлых ионов генетическим структурам обуславливает формирование качественно иных типов повреждений ДНК, нежели при действии электромагнитных видов ионизирующих излучений. И, прежде всего, это касается формирования наиболее тяжёлых нарушений, какими являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Пересечение тяжёлой заряженной частицей участка ДНК приводит к нарушению целостности не только двух комплементарных нитей ДНК, но при этом повреждаются и другие молекулярные структуры, прилегающие к данному сайту. Такие кластерные повреждения наиболее трудны для репарации восстановительными системами клеток. Они являются молекулярным субстратом клеточной гибели, образования различного рода мутаций хромосом, злокачественной трансформации. Очевидна необходимость тщательного исследования закономерностей и механизмов формирования и репарации такого рода повреждений. С этой целью в нашей лаборатории были предприняты исследования индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии излучений с разными физическими характеристиками. Для этого были использованы эффективные современные методы, позволяющие проводить изучение формирования ДР ДНК в ядрах отдельных клеток: метод иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи конъюгированных с разными флуоресцентными красителями антител специфичных к белкам (метод ДНК-фокусов).

С использованием метода иммуноцитохимического окрашивания и конфокальной микроскопии была изучена кинетика формирования и элиминации радиационно-индуцированных  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах фибробластов при действии  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  и ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$  [6]. Было продемонстрировано, что при действии ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$  в фибробластах человека формируется больше  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов, чем при действии  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$ . Было установлено, что в пострадиационный период элиминация радиационно-индуцированных фокусов при действии тяжёлых ионов замедлена по сравнению с  $\gamma$ -облученными клетками. Это обстоятельство свидетельствует о формировании более сложных, кластерных повреждений ДНК, индуцированных ускоренными ионами.

Таким образом, использование моноэнергетичных заряженных частиц в радиационно-генетических исследованиях позволило установить, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с различным генотипом, оцениваемая по индукции генных и структурных мутаций, детерминирована двумя факторами различной природы: физическим фактором, определяющим особенностями передачи энергии излучений и влияющим на характер индуцируемых повреждений ДНК, и биологическим - эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации повреждений

генетических структур клеток. Роль биологического фактора является зависимой от ЛПЭ излучений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Michalik V. Model of DNA damage induced by radiations of various qualities // *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, V.62, p.9-20.
2. Boreyko A.V., Krasavin E. A. Mutagenic effect of accelerated heavy ions on bacterial cells. "Physics of Particles and Nuclei", 2011, V. 42, No 6, p. 998-1024
3. Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991
4. Комова О.В., Красавин Е.А. Закономерности SOS-ответа в клетках *E. coli* при действии плотниоизирующих излучений. Труды IV съезда по радиационным исследованиям (всероссийский) Москва, Изд-во Росс. ун-та. дружбы народов, т. III, 2001, с.7-22.
5. Говорун Р.Д., Шмакова Н.Л., Кошлань И.В. и др. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки млекопитающих и человека. Физика элементарных частиц и атомного ядра (ЭЧАЯ), т.35. № 6, 2004, с. 1483 – 1511.
6. Jezkova L. et al. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of YH2AX/53BP1 foci. *Nanoscale*, DOI: 10.1039/c7nr06829h.

## **МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНДУКЦИИ И РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

*А.Н. Бугай, М. Батмунх, Л. Баярчимэг, М.А. Васильева, Э.Б. Душанов, А.Ю. Пархоменко*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия  
e-mail: bugay@jinr.ru

*Резюме.* Разработана иерархия математических моделей для расчета формирования и репарации повреждений ДНК, в первую очередь, двунитевых разрывов, при действии ионизирующих излучений с различной линейной передачей энергии на нормальные и опухолевые клетки млекопитающих и человека.

Ключевые слова: повреждения ДНК, репарация ДНК, математические модели

## **MATHEMATICAL MODELING OF INDUCTION AND REPAIR OF DNA DAMAGE UNDER EXPOSURE TO RADIATIONS WITH DIFFERENT PHYSICAL CHARACTERISTICS**

*A.N. Bugay, M. Batmunkh, L. Bayarchimeg, M.A. Vasilyeva, E.B. Dushanov, A.Yu. Parkhomenko*

Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia  
e-mail: bugay@jinr.ru

*Summary.* A hierarchy of mathematical models has been developed to calculate the formation and repair of DNA lesions, primarily double-strand breaks, under the action of ionizing radiation with different linear energy transfer on normal and tumor cells in mammals and humans.

Key words: DNA lesions, DNA repair, mathematical models

Среди широкого спектра различных повреждений ДНК, возникающих при действии ионизирующих излучений, наиболее тяжёлыми нарушениями, приводящими к клеточной гибели, структурным мутациям и генетической нестабильности, являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Несмотря на большое число экспериментальных работ, посвященных исследованиям индукции и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками, целый ряд эффектов, в особенности быстрых первичных физико-химических процессов передачи энергии при прохождении частиц через молекулярные структуры, недоступен для прямого измерения. В связи с этим особое значение приобретает развитие математических моделей.

В последние годы авторами активно развивается иерархия биофизических моделей радиационно-индуцированных эффектов, включающая физические, химические и биологические процессы. Ключевым элементом этой иерархии является описание начального физического взаимодействия с элементами клетки на молекулярном уровне. Для этой цели в основном нами применялся специализированный Монте Карло код Geant4-DNA. Исторически сложилось, что практически все Монте Карло коды моделируют взаимодействия частиц в жидкой воде как биологическом фантоме из-за преобладания ее в клетке, а также из-за ее роли в качестве источника реактивных свободных радикалов. Формирование прямых повреждений ДНК в ходе процессов ионизации и разрывов связей приходится

описывать дополнительными модификациями кода, вводя эмпирические сечения соответствующих процессов. Для этого разработан подход, основанный на применении методов молекулярной динамики. Важным этапом модельной иерархии также является моделирование физико-химических и химических стадий радиолиза воды, а также реакционно-диффузионных явлений, приводящих к косвенным повреждениям ДНК. В ходе расчетов удалось вычислить соотношение между прямыми и косвенными первичными ДР ДНК в широком диапазоне линейных передач энергии (ЛПЭ) частиц.

Далее необходимо смоделировать цепочку биохимических реакций, чтобы описать пути репарации ДР ДНК и ее конечные этапы, связанные с формированием мутаций и, в конечной степени, возможной гибелью клетки, которые можно непосредственно сравнить с экспериментальными данными. Авторами были разработаны математические модели разной степени сложности, описывающие кинетику репарации ДР ДНК и выживаемость различных типов клеток, в том числе фибробластов, лимфоцитов, нервных клеток-предшественников, стволовых клеток и т.д. Верификация результатов кинетики репарации проводилась путем сравнения с экспериментальными данными, полученными с помощью иммуно-гистохимических методов и метода преждевременной конденсации хроматина. Показано, что даже относительно простые кинетические модели, не учитывающие полную цепочку биохимических процессов, лежащих в основе индукции повреждений ДНК и клеточной гибели, позволяют достаточно хорошо воспроизвести широкий набор экспериментальных данных. Повышение уровня детализации в кинетических моделях репарации позволяет, с одной стороны, учесть особенности радиочувствительности различных линий клеток, в том числе с дефектами в работе определенных генов. С другой стороны, это достигается ростом числа неизвестных параметров модели, рассчитать или определить из эксперимента которые становится весьма затруднительным. Таким образом, в каждом индивидуальном случае требуется нахождение определенного баланса между сложностью и затратами на создание модели и ее предсказательной способностью.

Показано также, что математическое моделирование в ряде случаев позволяет предсказать структуру и изменение функций белков, кодируемых генами, в которых ошибочная репарация завершилась формированием мутаций. Проведенные расчеты для определения структур глутаматных рецепторов NMDA и AMPA в нервных клетках выявили согласие с имеющимися экспериментальными данными по измерению вольт-амперных характеристик синапсов, содержащих белки с рассмотренными мутациями.

Таким образом, на сегодняшний день теоретическая радиобиология достигла достаточно высокого уровня описания экспериментов *in vitro*, что в основном обусловлено успехами в разработке методов Монте Карло моделирования начальных процессов передачи энергии излучения веществу на молекулярном уровне. Дальнейшее развитие теоретической радиобиологии по мере накопления наших знаний будет состоять в дальнейшем пополнении и выстраивании элементов иерархии математических моделей.



**ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ВТОРИЧНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ  
ПРОТОНОВ ЧЕРЕЗ БЕТОННУЮ КОНСТРУКЦИЮ**

*Т.М. Бычкова<sup>1,2</sup>, О.В. Никитенко<sup>1,2</sup>, Т.М. Трубченкова<sup>2</sup>, Н.Ю. Воробьева<sup>2</sup>,  
А.Г. Молоканов<sup>3</sup>, А.Н. Осипов<sup>2</sup>, А.А. Иванов<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА  
России, Москва, Россия

<sup>3</sup>Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия

e-mail: [taisibichkova@mail.ru](mailto:taisibichkova@mail.ru)

*Резюме.* В экспериментах, выполненных на фазотроне ОИЯИ проведена радиобиологическая оценка эффективности протонов с энергией 650-660 МэВ после прохождения через бетонную конструкцию толщиной 20, 40 и 80 см. Исследованы зависимости доза-эффект в дозах от 0,02 до 25 Гр. Жизненный статус облученных животных охарактеризован через 24 часа после воздействия излучения. Наличие цитогенетических эффектов и молекулярных повреждений ДНК указывает на мутагенное и канцерогенное действие вторичного излучения.

*Ключевые слова:* хромосомные aberrации, двунитевые разрывы ДНК; спленциты мышей; протоны; вторичное ионизирующее излучение

**DNA DAMAGE AND CYTOGENETIC EFFECTS OF SECONDARY  
RADIATION PRODUCED WHEN PROTONS PASSAGE THROUGH A CONCRETE  
STRUCTURE**

*T.M. Bychkova<sup>1,2</sup>, O.V. Nikitenko<sup>1,2</sup>, T.M. Trubchenkova<sup>2</sup>, N.Yu. Vorobieva<sup>2</sup>,  
A.G. Molokanov<sup>3</sup>, A.N. Osipov<sup>2</sup>, A.A. Ivanov<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>State Scientific Center of the Russian Federation - Institute of Biomedical Problems  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Federal Medical Biophysical Center named after N.N. A.I. Burnazyan FMBA of  
Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

e-mail: [taisibichkova@mail.ru](mailto:taisibichkova@mail.ru)

*Summary.* In experiments performed at the JINR Phasotron, a radiobiological evaluation of the efficiency of protons with an energy of 650-660 MeV after passing through a concrete structure 20, 40 and 80 cm thick was carried out. The dose-effect dependences were studied in doses from 0,02 to 25 Gy. The vital status of irradiated animals was characterized 24 hours after exposure to radiation. The presence of cytogenetic effects and molecular damage to DNA indicates the mutagenic and carcinogenic effects of secondary radiation.

*Key words:* chromosomal aberrations, double-strand DNA breaks; mouse splenocytes; protons; secondary ionizing radiation

Вопрос колонизации планет Солнечной системы и Луны вызывает интерес и активно дискутируется. В силу высокой стоимости доставляемых с Земли строительных материалов, для строительства планетарных баз предлагаются материалы на основе грунта планет, например поверхностный слой сыпучего лунного грунта (реголит). По своим физическим характеристикам (плотность, защита от ионизирующего излучения) такие материалы будут наиболее близки к земному бетону. Помимо основных функций, конструкции из таких материалов должны защищать от

космического излучения, представляющего серьёзную опасность для здоровья человека. Основным компонентом космического ионизирующего излучения являются протоны различной энергии, около 92% солнечного и около 85% галактического ионизирующего излучения. Высокоэнергетические протоны, обладающие проникающей способностью, при взаимодействии со строительными материалами генерируют вторичное излучение, состоящее в основном из вторичных протонов, нейтронов, пи-мезонов и гамма-квантов.

Цель работы явилось исследование цитогенетических изменений клеток костного мозга и доли спленцитов с высоким уровнем ДР ДНК у мышей, подвергавшихся воздействию излучения, формирующегося при прохождении пучка 650 МэВ протонов через бетонную преграду толщиной 20, 40 и 80 см.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 214 аутбредных мышах ICR CD-1, самках, с массой от 24-35 г, SPF-категории, содержащихся в конвенциональных условиях. Эксперимент выполнен на мышах, облученных вторичным излучением из бетонных мишеней, после прохождения пучка протонов диаметром 5 см на входе, с энергией 650 МэВ на фазотроне Объединенного института ядерных исследования (ОИЯИ) г. Дубна. Поле смешанного (гамма-кванты и адроны) и вторичного излучения формировалось в результате прохождения протонного пучка через бетонную конструкцию толщиной 20, 40 и 80 см. Животных располагали в специально сконструированной клетке из перфорированного пластика с девятью (1-9) ячейками для мышей, каждая размером 5×5×5 см. В каждую ячейку помещали по 2 животных. Клетку располагали горизонтально, перпендикулярно оси пучка таким образом, чтобы ось пучка проходила через центральную ячейку 5. Для сравнения было проведено облучение мышей  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в широком диапазоне доз от 0,02 Гр до 25 Гр.

Результаты. В эксперименте с  $\gamma$ -облучением получена классическая кривая доза-эффект по числу кариоцитов с выходом на плато при сверхлетальных дозах. Вторичное излучение, формирующееся после прохождения протонов через бетон толщиной 80 см, по всем экспериментальным точкам обусловило больший поражающий эффект в сравнении с  $\gamma$ -квантами, при этом отмечается определенная асимметрия биологического эффекта пучка – в ячейках с 9 по 6 он оказался выше чем в ячейках 1-4. При толщине конструкции 20 и 40 см повышение радиобиологического эффекта не было значительным. Полученные различия в биологическом эффекте вторичного излучения по толщине 80 см мы склонны объяснить присутствием в его составе существенной нейтронной компоненты.

Наиболее специфичными и достаточно чувствительными показателями радиационного воздействия являются цитогенетические эффекты в форме задержки митозов и возникновения хромосомных повреждений (аббераций).

В эксперименте с  $\gamma$ -облучением получена классическая кривая доза-эффект с рядом нюансов в части хромосомных аббераций. В области сверхлетальных доз число абберантных клеток через 24 часа после облучения достигло максимума и вышло на плато после первого митоза. В дозе 0,02 Гр продемонстрирована известная зона гиперчувствительности, а начиная с доз 0,1 Гр до 2,5 Гр, отмечается пропорциональная зависимость доза-эффект. Митотический индекс – как показатель радиационного воздействия продемонстрировал идеальный ответ доза-эффект.

В ячейке 5 отмечается прямая зависимость доза-эффект по протонному облучению, при этом число абберантных клеток совпадало с соответствующими по дозе значениями у гамма-облученных животных. В крайних ячейках 1 и 9 выход хромосомных аббераций превысил таковой у соответствующей дозовой группы гамма-облученных животных.

Митотический индекс у животных из ячейки 5 оказался выше, чем у гамма-облученных животных, облученных в сопоставимых дозах.

Показано повышение митотического индекса у животных, облученных в крайних ячейках – максимальное при толщине 80 см и минимальное при толщине защиты 20 см. Радиационная стимуляция митотической активности радиочувствительных клеток, сопровождающаяся повышенным выходом аберрантных клеток, логично может стать предвестником канцерогенного эффекта радиации в дальнейшем. Однако в этом направлении, безусловно, необходимы дополнительные исследования.

Для оценки доли спленоцитов с высоким уровнем двунитевых разрывов ДНК использовали проточно-цитометрический анализ  $\gamma$ H2AX+ и TUNEL+ клеток. Бетонная защита позволяет существенно снизить поток первичного протонного излучения, с увеличением толщины этой преграды уменьшая выраженность негативных биологических эффектов у мышей, облучаемых в центре пучка. Однако с увеличением толщины преграды с 20 до 80 см и расстояния от центральной оси пучка с 0 до 20 см существенно меняется спектр вторичного излучения и увеличивается доля нейтронной компоненты, что также вызывает негативные биологические эффекты, выражающиеся в значимом ( $p < 0.05$ ) повышении доли спленоцитов с высоким уровнем повреждения ДНК у мышей, облучаемых на расстоянии 20 см от центра пучка и получающих относительно низкие дозы первичного излучения (0,10-0,17 Гр).

В целом проведенные эксперименты показали, что бетонная защита толщиной 80 см не позволяет полностью снизить негативные радиобиологические эффекты протонного излучения из-за выраженной генерации вторичного излучения, особенно его нейтронной компоненты. Данный факт указывает на необходимость дополнительной защиты от нейтронов.

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В РЕПАРАЦИИ РАЗРЫВОВ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

*С.А. Васильев*

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия  
stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

*Резюме.* Благодаря своей организации, ДНК является стабильной молекулой, имеющей большой потенциал к репарации большинства повреждений за счет наличия второй цепи. Разрывы обеих цепей ДНК представляют собой наиболее серьезные повреждения ее структуры с опасными для клетки последствиями и поэтому требуют наличия большого количества регуляторных механизмов, направленных на их обнаружение и репарацию. Среди таких механизмов важную роль играют эпигенетические механизмы, связанные с метилированием ДНК и модификациями гистонов. Кроме того, межиндивидуальная вариабельность по эпигенетическим маркерам связана с индивидуальной чувствительностью клеток и организмов к воздействию мутагенов, включая ионизирующее излучение. Рассмотрение таких механизмов и маркеров является целью настоящего исследования.

*Ключевые слова:* стабильность генома, репарация ДНК, эпигенетика, метилирование ДНК, модификации гистонов

## EPIGENETIC FACTORS IN THE REPAIR OF DNA DOUBLE HELIX BREAKS

*S.A. Vasilyev*

Research Institute of Medical Genetics,  
Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia  
stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

*Abstract.* Due to its organization, DNA is a stable molecule with a great potential for repairing most damage due to the presence of a second strand. Breaks in both DNA strands represent the most serious damage to its structure with dangerous consequences for the cell and therefore require a large number of regulatory mechanisms aimed at their detection and repair. Among such mechanisms, epigenetic mechanisms associated with DNA methylation and histone modifications play an important role. In addition, interindividual variability in epigenetic markers is associated with the individual sensitivity of cells and organisms to the effects of mutagens, including ionizing radiation. Consideration of such mechanisms and markers is the purpose of this study.

*Keywords:* genome stability, DNA repair, epigenetics, DNA methylation, histone modifications

Модель Уотсона-Крика организации ДНК в клетках в виде двойной спирали объяснила основы стабильности молекулы ДНК в клетке. Стабильность вдоль одной цепи обеспечивается за счет сахарофосфатного скелета, тогда как стабильность связей между цепями задается связями между комплементарными нуклеотидами. Эти же свойства ДНК обеспечивают эффективную репарацию ДНК, так как большинство типов повреждений не приводит к полному разрушению структуры двойной спирали. Единственным исключением являются двунитевые разрывы ДНК, при которых нарушается линейная стабильность одновременно двух цепей и которые вследствие этого являются наиболее сложно репарируемыми и опасными повреждениями. Основная опасность заключается в их неправильной репарации и образовании

хромосомных aberrаций, включая дисцентрические и кольцевые хромосомы, которые приводят к индукции хромосомной нестабильности, гибели или трансформации клеток.

Эффективность репарации ДНК и уровень хромосомных нарушений в клетках фенотипически здоровых индивидов, в частности, после воздействия ионизирующего излучения, во многом генетически детерминированы. Классические исследования с помощью близнецового метода показали, что наследуемость частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках составляет 62,7 %, а частоты микроядер – 68%. Такое сравнение показывает, что наследуемость частоты хромосомных нарушений оказывается значительно выше наследуемости риска развития различных форм опухолей: опухоли простаты – 42 %, опухоли прямой кишки – 35 %, рака молочной железы – 27 %. Несмотря на такую высокую наследуемость, многолетние исследования, в том числе с помощью широкогеномных методов, не позволили выявить гены, генетические варианты в которых оказывают значимое действие на частоту хромосомных aberrаций. Исключением явились лишь гены, мутации в которых приводят к моногенным формам наследственных заболеваний с повышенной хромосомной нестабильностью, включая атаксию-телеангиэктазию. Как и для других случаев так называемой «упущенной наследуемости» для сложных количественных признаков, основные надежды обнаружения наследственных факторов, влияющих на стабильность генома, связаны с исследованием эпигенетических механизмов.

Эпигенетический фон в клетке складывается из множества составляющих, включая метилирование некодирующих последовательностей ДНК и генных промоторов, профиль различных модификаций гистонов, экспрессию различных некодирующих РНК. Ключевым вопросом является выявление параметров эпигенетического фона, определяющих его влияние на поддержание стабильности генома клеток на различных стадиях онтогенеза. Одним из таких параметров эпигенетического фона является изменение уровня метилирования генома. Средний уровень метилирования генома отражает уровень метилирования CpG-сайтов, локализующихся как в белок-кодирующих генах, так и в значительно большей степени в различных повторяющихся последовательностях. Связь между гиперметилированием промоторов отдельных генов и повышением частоты хромосомных aberrаций является достаточно хорошо изученным феноменом как для нормальных, так и для опухолевых клеток. Меньше известно о связи с уровнем хромосомных нарушений метилирования ДНК в повторяющихся последовательностях. Снижение глобального уровня метилирования генома, характерное для некоторых тканей и часто встречающееся в опухолях, может быть связано с повышением частоты хромосомных аномалий в клетках человека. В наших работах и работах других авторов было показано, что в определенных случаях эти изменения уровня метилирования пропорциональны частоте структурных и числовых хромосомных нарушений, возникающих в нормальных и опухолевых клетках после мутагенного воздействия. В частности, была обнаружена обратная зависимость между уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1 и частотой aberrаций хроматидного типа у работников радиохимического производства в условиях хронического низкодозового воздействия ионизирующего излучения.

Следующим свидетельством в пользу влияния эпигенетических механизмов на эффективность репарации ДНК является значительная вариация в радиочувствительности различных типов клеток организма, обладающих одним и тем же генотипом и отличающихся лишь эпигенетическим ландшафтом, приобретенным в ходе разворачивания эпигенетической программы развития организма. Более того, ответ на повреждение ДНК в клетках может динамично меняться вместе с изменением эпигенетического ландшафта в ходе дифференцировки. Примером является изменение параметров репарации ДНК и апоптоза при дифференцировке из стволовых клеток в

клетки-предшественники и терминально дифференцированные клетки, показанное в том числе и в наших работах.

Наконец, эпигенетические механизмы в узком молекулярно-биологическом смысле (регуляция активности генов за счет метилирования ДНК, модификаций гистонов, работы некодирующих РНК) играют значительную роль и непосредственно в регуляции ответа на повреждение ДНК в клетках. Во-первых, существуют модификации гистонов, непосредственно связанные с сигналингом и репарацией повреждений ДНК. Так, наиболее известным маркером двунитевых разрывов ДНК являются фосфорилированные фокусы гистона H2AX, которые сами по себе являются эпигенетическим феноменом. Фокусы белков репарации ДНК представляют собой собранные комплексы, состоящие из собственно белков репарации двунитевых разрывов ДНК и сигнальных медиаторов, участвующих в активации компонентов контрольных точек клеточного цикла. Поэтому, клетки, содержащие фокусы  $\gamma$ H2AX, имеют измененный эпигенетический фон, потенциально влияющий на функционирование белков репарации ДНК и экспрессию кодирующих их генов. Вследствие этого клетки могут эффективнее реагировать на воздействие мутагенов за счет уже активированной системы ответа на повреждение ДНК. В свою очередь, повышенная активность систем репарации ДНК и контрольных точек клеточного цикла может приводить к снижению спонтанной и индуцированной мутагенами частоты хромосомных нарушений. В наших исследованиях выявлено влияние спонтанного уровня фокусов  $\gamma$ H2AX на частоту хромосомных нарушений в соматических клетках человека. Была выявлена отрицательная корреляция спонтанного уровня фокусов  $\gamma$ H2AX в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями до нейтронной терапии с частотой аберраций хромосомного типа после окончания терапии. Данный эффект подтверждался в лимфоцитах здоровых индивидов в условиях *in vitro*: наблюдалась значимая отрицательная корреляция спонтанного уровня фокусов  $\gamma$ H2AX с частотой центромеро-негативных микроядер после воздействия радиации в дозе 2 Гр *in vitro* в лимфоцитах здоровых индивидов.

Через 70 лет после открытия двойной спирали ДНК мы понимаем основные механизмы поддержания стабильности ДНК и знаем их основных участников, но все еще не можем с уверенностью сказать, какие именно факторы определяют индивидуальные различия в эффективности этих процессов. Эпигенетические факторы, несомненно, вносят свой вклад, однако детальные механизмы реализации их влияния остаются неясными. Несмотря на это, делаются попытки использовать информацию об эпигенетическом статусе нормальных и опухолевых клеток в прогнозе воздействия ионизирующего излучения в ходе лучевой терапии злокачественных новообразований.

## **ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИАПОПТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АЛЬФА1-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*М.В. Васин<sup>1</sup>, И.Б. Ушаков<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГНЦ РФ – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия  
e-mail: [vv4sin80@yandex.ru](mailto:vv4sin80@yandex.ru)

*Резюме* Радиационный апоптоз вносит существенный вклад в танатогенез при острой лучевой болезни и при местном лучевом поражении тканей в практике радиотерапии онкологических больных. Альфа1-адреноагонисты могут стабилизировать митохондриальный гомеостаз при воздействии радиации, тем самым, снижая вероятность радиационного апоптоза клеток и сохранения оптимального функционирования ткани через экспрессию сиртуина 1, NAMPT и PGC-1 $\alpha$ , а также повышения уровня НАД и АТФ.

*Ключевые слова:* радиационный апоптоз, альфа1-адренергические агонисты, сиртуин 1, NAMPT, PGC-1 $\alpha$ , НАД, АТФ

### **POTENTIAL MECHANISMS OF ANTIAPOPTIC EFFECT OF ALFA1-ADRENERGIC AGONISTS UNDER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION**

*M.V. Vasin<sup>1</sup>, I.B. Ushakov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> State Scientific Center - Burnazyan Federal Medical Biophysical Center FMBA of Russia, Moscow, Russia  
e-mail: [vv4sin80@yandex.ru](mailto:vv4sin80@yandex.ru)

*Summary* Radiation apoptosis makes a significant contribution to thanatogenesis in acute radiation sickness and in local radiation damage of tissues in the practice of radiotherapy of cancer patients. Alpha1-adrenergic agonists can stabilize mitochondrial homeostasis when exposed to radiation, thereby reducing the likelihood of radiation apoptosis of cells and maintaining optimal tissue functioning through expression of sirtuin 1, NAMPT and PGC-1 $\alpha$ , as well as increasing NAD and ATP levels.

*Keywords:* radiation apoptosis, alpha1-adrenergic agonists, sirtuin 1, NAMPT, PGC-1 $\alpha$ , NAD, ATP

Радиационный апоптоз вносит существенный вклад в танатогенез при острой лучевой болезни и при местном лучевом поражении тканей в практике радиотерапии онкологических больных. Альфа1-адреноагонисты могут стабилизировать митохондриальный гомеостаз при воздействии радиации, тем самым, снижая вероятность радиационного апоптоза клеток и сохранения оптимального функционирования ткани. При радиационном поражении в клинически значимых дозах имеет место разрушение структуры мембран митохондрий, снижение их мембранного потенциала и запуск процессов апоптоза. На фоне данных процессов экспрессия сиртуина 1, NAMPT) и PGC-1 $\alpha$ , а также уровни НАД и АТФ снижались.

Противолучевой эффект альфа1-адреноагонистов на слюнных железах связан со снижением радиационного поражения митохондрий. Фенилэфрин – альфа1-адреноагонист уменьшает выраженность структурных лучевых поражений митохондрий и стимулирует функцию клеток в условиях ее ослабления под действием радиации. Он устранял отрицательное действие радиации на экспрессию NAMPT и при этом увеличивал ее активность в два раза. NAMPT катализирует конденсацию никотинамида с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом с образованием никотинамидмононуклеотида, первой ступени синтеза НАД<sup>+</sup>, ключевого субстрата цикла Кребса. NAMPT является лимитирующим фактором синтеза НАД и функционирования НАД-зависимых ферментов. К ним относятся НАД-зависимые ядерные деацетилазы – сиртуины.

Фенилэфрин устраняет подавление радиацией функции сиртуина 1, увеличивая ее в два раза. Сиртуин 1 активирует функцию AMPK, тем самым повышая уровень НАД<sup>+</sup> и биогенез митохондрий, а деацетилируя PGC-1 $\alpha$ , обеспечивает митохондриальный биогенез, необходимую интенсивность метаболизма и клеточного дыхания и ограничивает процессы гликолиза и воспаления. Сиртуин 1 через PI3K/Akt-сигнальный путь участвует в регуляции энергетического метаболизма, окислительного стресса и продукции индуцированных радиацией активных форм кислорода. Фенилэфрин через экспрессию транскрипционного ядерного фактора PPAR и индукцию фосфорилирования AMPK повышает выживаемость клеток, сохраняет мембранный потенциал митохондрий и путем активации PI3K/Akt- и ERK1/2-пути подавляет проапоптотические белки Bad, благодаря стимуляции их фосфорилирования, тем самым, усиливая антиапоптотическое действие семейства Bcl-2. Процессы, связанные с экспрессией PPAR, происходят относительно медленно, достигая максимума через 3–6 ч после воздействия фенилэфрина.

Впервые высокоаффинные альфа1-адренорецепторы на лимфоидных клетках костного мозга обнаружил Дж. Маестрони (1996). Альфа1-адренорецепторы есть также на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и фибробластах кожи, при стимуляции которых происходит активация синтеза ДНК. Реализация противолучевого эффекта альфа1-адреноагонистов может осуществляться *in vitro* при непосредственном воздействии на клетку через альфа1-адренорецепторы. Альфа1-адренорецепторы через вовлечение PPAR-AMPK-PGC-1 $\alpha$ -пути, и экспрессию глюкозного транспортера типа 4 усиливают окислительное фосфорилирование и синтез АТФ.



## **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ХРОНИЧЕСКОЕ РАДИАЦИОННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ**

*Гераськин С.А., Битаршвили С.В., Бондаренко В.С., Бондаренко Е.В., Васильев Д.В.*  
ВНИИ радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия  
e-mail: stgeraskin@gmail.com

*Резюме.* В сообщении представлены основные результаты многолетних наблюдений за популяциями сосны обыкновенной в разных радиоэкологических ситуациях и климатических зонах. Из представленных в докладе данных следует, что хроническое радиационное воздействие можно рассматривать как экологический фактор способный дестабилизировать временную динамику популяционных показателей, менять генетическую и эпигенетическую структуру популяций, модифицировать их гормональный статус.

*Ключевые слова:* сосна обыкновенная, хроническое облучение, метилирование, экспрессия генов, фитогормоны, эпигенетика

## **GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS FOR ADAPTIVE RESPONSE OF SCOTT PINE TO CHRONIC RADIATION EXPOSURE**

*Geraskin S.A., Bitarishvili S.V., Bondarenko V.S., Bondarenko E.V., Vasiliev D.V.*  
Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia  
e-mail: stgeraskin@gmail.com

*Summary.* The report presents the main results of long-term observations on Scots pine populations in different radioecological situations and climatic zones. From the data presented it follows that chronic radiation exposure can be considered as an ecological factor capable of destabilizing the temporal dynamics, changing the genetic and epigenetic structure of populations, and modifying their hormonal status.

*Key words:* Scots pine, chronic exposure, methylation, gene expression, phytohormones, epigenetics

Оценка эффектов в популяциях растений, населяющих загрязненные радионуклидами территории, осложняется тем, что эффекты хронического радиационного воздействия не столь ярко выражены как эффекты острого облучения в высоких дозах, а всю совокупность действующих на природные популяции факторов невозможно смоделировать в лаборатории. Поэтому для решения этой задачи мы должны выйти из уютных лабораторий в поле и посмотреть: какие же процессы реально происходят в популяциях растений, населяющих радиоактивно загрязненные территории? В этой связи нас будут интересовать ответы на следующие вопросы:

-каков мутагенный эффект хронического радиационного воздействия в низких дозах?

-какова судьба индуцированных мутаций в измененных экологических условиях?

-является ли хроническое радиационное воздействие фактором отбора, изменяющим генетическую структуру популяций?

В течение 14 лет мы наблюдали за популяциями сосны, населяющими контрастные по уровню радиоактивного загрязнения участки в Брянской области и в Полесском Радиационном Заповеднике, Белоруссия. Данные о радиоактивном загрязнении почвы и растений использовали в специально разработанной дозиметрической модели для оценки поглощенных растениями доз. Годовые дозы в

исследуемых популяциях меняются в широком диапазоне от 10 до 130 мГр. В Брянской области основным дозообразующим радионуклидом является цезий. На белорусских участках вклад в поглощенную дозу вносят стронций, изотопы плутония и америций.

Многолетний опыт нашей лаборатории говорит о том, что анализ цитогенетических эффектов чувствительный, надежный и хорошо воспроизводимый метод. На протяжении всего времени наблюдений частота цитогенетических нарушений в хронически облучавшихся популяциях статистически значимо превосходила контрольный уровень. Более того, анализ спектра мутаций показал, что в популяциях сосны с наиболее загрязненных участков частота двойных мостов и фрагментов статистически значимо превышала контрольный уровень в течение всех лет наблюдений. Поскольку такие цитогенетические нарушения типичны для облученных организмов, эти данные являются подтверждением радиационной природы наблюдаемых изменений.

Наблюдения за исследуемыми популяциями продолжались 14 лет, поэтому накопленный объем экспериментальных данных позволил поставить вопрос: как частота цитогенетических эффектов изменяется во времени? В контрольных популяциях изменение частоты цитогенетических нарушений во времени подчиняется циклическим закономерностям. Такой характер изменения типичен для многих биологических и экологических систем. В противоположность этому, в популяциях, развивающихся в условиях хронического облучения, циклические функции уже не являются лучшими в плане аппроксимации. Более того, для хронически облучаемых популяций, в отличие от контрольных, характерно увеличение диапазона изменчивости и снижение частоты цитогенетических нарушений со временем, прошедшим с момента аварии. Это может быть связано со снижением поглощенной дозы, которое обусловлено радиоактивным распадом и перераспределением радионуклидов внутри экосистемы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что хроническое техногенное воздействие ведет к увеличению диапазона изменчивости и дестабилизации временной динамики цитогенетических показателей.

В этих же популяциях сосны частота мутаций генов, контролирующих биосинтез ключевых ферментов антиоксидантной защиты и основных путей метаболизма статистически значимо превышала контрольный уровень и росла с мощностью, поглощенной растениями дозы. Таким образом, даже спустя десятки лет после аварии на ЧАЭС в исследованных популяциях сосны формируется семенное потомство с высоким уровнем мутационной изменчивости.

В первый период после Чернобыльской и Фукусимской аварий повышенная частота нарушений апикального доминирования наблюдалась в популяциях молодых хвойных деревьев. С целью расшифровки механизма такой трансформации нами были изучены несколько популяций красной японской сосны, населяющих контрастные по уровню радиационного воздействия участки в префектуре Фукусима. Частота нарушений апикального доминирования и частота цитогенетических эффектов в хвое красной японской сосны превышала контрольный уровень. Однако если частота аберрантных клеток росла с дозой, то частота нарушений апикального доминирования с дозой не увеличивалась. В нашем исследовании впервые было показано, что хроническое радиационное воздействие способно менять соотношение концентраций ключевых фитогормонов в хвое красной японской сосны. С учетом полного отсутствия в научной литературе информации о влиянии хронического облучения на эту, наиболее важную регуляторную систему растений, настоящее исследование заполняет существенный пробел в наших знаниях.

Остается ли прежней генетическая структура популяций, вынужденных развиваться в условиях хронического облучения? Ответ на этот вопрос был получен

двумя методами - при исследовании изоферментного полиморфизма, а также полиморфизма ДНК методом AFLP. Построенная на основе оцененных двумя принципиально разными методами генетических расстояний дендрограмма совпала и разделила исследуемые популяции на две группы в соответствии с их географическим положением. Однако в пределах этих подгрупп популяции расположились по уровню радиоактивного загрязнения участков. Следовательно, хроническое радиационное воздействие можно рассматривать как экологический фактор, способный менять генетическую структуру популяции.

Типичная для населяющих загрязненные территории растений высокая частота мутагенеза может вести к ускорению микроэволюционных процессов в популяциях. Однако наиболее правдоподобное объяснение быстрой и массовой адаптации растений к стрессовым условиям окружающей среды связано с эпигенетическими изменениями. Эпигенетическая регуляция геной экспрессии особенно важна для долгоживущих деревьев, поскольку позволяет им демонстрировать широкий спектр фенотипов в ответ на изменения окружающей среды. Среди эпигенетических механизмов метилирование генома рассматривают в качестве защитной стратегии, направленной на предотвращение нестабильности генома и массовой транспозиции мобильных генетических элементов. Из результатов наших исследований видно, что геном хронически облучаемых сосен гиперметирирован. Однако связь с уровнем радиационного воздействия этого показателя отсутствует.

Сравнение эффектов хронического облучения в популяциях сосны из зон Чернобыльской и Фукусимской аварий показало, что в обоих случаях генетические расстояния между популяциями связаны с уровнем радиоактивного загрязнения. А вот эпигенетические изменения разнонаправленны. В чернобыльской зоне геном, как и в предыдущем случае, гиперметирирован, что связано с предотвращением массовой транспозиции МГЭ в условиях хронического облучения. В зоне фукусимской аварии уровень радиоактивного загрязнения значительно меньше и геном сосен гипометирирован, что может быть связано с увеличением активности определенных групп генов. Каких именно – это предмет наших исследований в настоящее время.

Функциональный анализ профилей транскрипции контрастных по устойчивости к облучению объектов - сосны обыкновенной и пастушьей сумки из хронически облучающихся популяций чернобыльской зоны показал, что основную роль в ответной реакции на хроническое радиационное воздействие играют гены, отвечающие за контроль ионного гомеостаза, транспозиций мобильных генетических элементов, биосинтеза гистонов и шаперонов. При этом не было обнаружено значимых изменений экспрессии генов, вовлеченных в репарацию ДНК. Этот результат был для нас довольно неожиданным, однако анализ литературы подтвердил, что в ответах на острое и хроническое облучение задействованы разные группы генов.

В целом, из представленных данных следует, что хроническое радиационное воздействие можно рассматривать как экологический фактор способный дестабилизировать временную динамику популяционных показателей, менять генетическую структуру популяций и модифицировать их гормональный статус. Причем в адаптивных реакциях сосны на хроническое радиационное воздействие важную роль играют эпигенетические механизмы.

Материалы выступления подготовлены при поддержке гранта РФФ № 21-16-00004.

## АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ГРЫЗУНОВ ИЗ ЗОНЫ ВЛИЯНИЯ ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОГО РАДИОАКТИВНОГО СЛЕДА

*Е.Б. Григоркина<sup>1</sup>, С.Б. Ракитин<sup>1</sup>, Г.В. Оленев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия  
e-mail: grigorkina@ipae.uran.ru

*Резюме.* Впервые исследован полиморфизм фрагмента гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК у грызунов из зоны ВУРС. Наибольшие значения индексов генетического разнообразия выявлены у животных из импактного и фонового участков (9.5 км) по сравнению с референтным (220 км). Нуклеотидное разнообразие и среднее число парных различий между гаплотипами оказались наибольшими у особей с сопредельного участка. Сделан вывод о радиогенном происхождении наблюдаемых эффектов и их переносе мигрантами на сопредельные территории.

*Ключевые слова:* митохондриальная ДНК, грызуны, ВУРС, миграция

## ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA IN RODENTS FROM EASTERN URALS RADIOACTIVE TRACE ZONE

*E.B. Grigorkina<sup>1</sup>, S.B. Rakiin<sup>1</sup>, G.V. Olenev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia grigorkina@ipae.uran.ru

*Summary.* Firstly polymorphism of gene cytochrome *b* fragment of mitochondrial DNA in rodents inhabiting EURT zone was analyzed. More high indices of genetic diversity in both samples from EURT zone and background territory (9.5 kms) as compared with reference one (220 kms) was found. Nucleotide diversity and average number of pair distinctions between haplotypes were greatest in specimens from contiguous site. Conclusion: observable effects are radio induced and transferred by migrants on adjacent territories.

*Key words:* mitochondrial DNA, rodents, EURT, migration

Радиобиологический интерес к исследованию митохондриального генома обусловлен высокой чувствительностью митохондриальной ДНК (мтДНК) и самих митохондрий к воздействию ионизирующей радиации и других повреждающих агентов [1]. Это связано с повышенным уровнем индуцируемых повреждений и низкой эффективности систем репарации ДНК в митохондриях. Тем не менее, сведения о влиянии хронического, пролонгированного низкодозового радиационного воздействия на митохондриальный геном у мелких млекопитающих из зон радиоактивного неблагоприятия, единичны [2]. В зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРС), образовавшегося в 1957 г. в результате Кыштымской радиационной аварии, исследование изменчивости мДНК проведено впервые. Основной дозообразующий радионуклид в зоне ВУРС – <sup>90</sup>Sr, который накапливается в скелете позвоночных и является источником постоянного облучения органов и тканей.

Цель работы: изучение уровня полиморфизма фрагмента (866 пн) гена цитохрома *b* (*cytb*) мтДНК в популяциях красных полевков (*Myodes rutilus* Pallas, 1779) из зоны ВУРС, сопредельной и географически удаленной референтной территорий. Материал и методы. Работа выполнена на красных полевках. Для проведения молекулярно-генетических исследований животные одного функционального статуса (неразмножающиеся сеголетки) были отловлены живоловками на трех участках: импактный, сопредельный фоновый и референтный. Импактный находится в зоне ВУРС (Челябинская обл.) в 13 км от эпицентра аварии, запас <sup>90</sup>Sr в почве составляет

9.7 МБк/м<sup>2</sup> (5.5–15.0), исходная плотность загрязнения почвы <sup>90</sup>Sr – 500 Ки/км<sup>2</sup> [3]. Сопредельный фоновый расположен на расстоянии 9.5 км от импактного, плотность загрязнения почвы <sup>90</sup>Sr – 44 кБк/м<sup>2</sup> (2 Ки/км<sup>2</sup>). Референтная группа животных доставлена из окрестностей Свердловской обл. расстояние 220 км, где документирован уровень загрязнения в пределах региональной нормы. Для проведения молекулярно-генетического анализа были получены образцы мышечной ткани от 30 особей. Выделение ДНК, амплификация, секвенирование, обработка последовательностей, детекция результатов проведены в ЦКП ИЭРиЖ УрО РАН.

Результаты и обсуждение. Выявлено более высокое гаплотипическое разнообразие по фрагменту гена *сyt b* у животных из зоны ВУРС ( $h=0.913\pm 0.111$ ;  $N=9$ ) и с сопредельной территории ( $h=0.936\pm 0.05$ ;  $N=13$ ), по сравнению с референтной выборкой ( $h=0.786\pm 0.151$ ;  $N=8$ ). Обращает на себя внимание более высокое значение этого индекса у зверьков с сопредельного участка. Нуклеотидное разнообразие и среднее число парных различий между гаплотипами оказались наиболее высокими в выборке полевок с сопредельного участка ( $\pi(x100)=0.456\pm 0.274$ ;  $k=3.949\pm 2.114$ ). При сравнении выборок из зоны ВУРС и референтного участка эти показатели оказались близкими по значениям ( $\pi(x100)=0.398\pm 0.337$ ;  $k=3.232\pm 2.122$  и  $\pi(x100)=0.392\pm 0.255$ ;  $k=3.393\pm 1.939$ ). По предварительным оценкам обнаружен достаточно высокий уровень межпопуляционной генетической дифференциации ( $F_{st}=0.112$ ), рассчитанной на основе дисперсии частот гаплотипов мтДНК; определяемая ею доля дисперсии составила 11.20% ( $P=0.018$ ). В итоге, наиболее высокие значения всех трёх индексов генетического разнообразия наблюдались в двух локалитетах: в выборках из зоны ВУРС и с сопредельной территории. Стоит отметить повышенный уровень нуклеотидного разнообразия и среднего числа парных различий между гаплотипами на прилежащем зоне ВУРС участке, где уровень радиоактивного загрязнения соответствует фоновым величинам.

Ранее при анализе изменчивости микросателлитных локусов у *M. rutilus* из этих же локалитетов нами были обнаружены существенные различия между красными полевками из зоны ВУРС и референтной выборки [4]. Также было выявлено возрастание некоторых показателей генетического разнообразия (число уникальных аллелей и индекс аллельного разнообразия) у животных на сопредельных территориях. Удельная активность <sup>90</sup>Sr, депонированного в костной ткани грызунов зоны ВУРС, составляла  $105.5\pm 92.1$  Бк/г, в то время как фоновая удельная активность не превышала 0.5 Бк/г. Максимальная и минимальная величины различались в 41 раз (329 Бк/г и 7.94 Бк/г). Мощность дозы на красный костный мозг мышеобразных из зоны ВУРС достигает 300 мкГр/ч [5]. Эти значения выше дозового порога в 100 мкГр/ч, установленного НКДАР ООН [6], что может приводить к радиационно-индуцированным биологическим эффектам.

Логично предположить, что наблюдаемая картина по показателям генетического разнообразия, оцененного по обоим молекулярным маркерам (изменчивости микросателлитной и мтДНК), может быть ассоциирована с дисперсиями животных. Результаты мечения животного населения разными биомаркерами (тетрациклин, родамин) выявили дисперсии красных полевок разного функционального статуса на сопредельный фоновый участок [7]. Следствием миграций является поток генов между популяциями и перенос радиационно-индуцированных эффектов на сопредельные территории, что приводит к увеличению параметров генетического разнообразия. С другой стороны, генетический обмен – это способ восстановления и повышения уровня экологической устойчивости под действием новых неблагоприятных факторов, влекущих развитие новых систем адаптации.

Таким образом, в результате пилотного исследования изменчивости фрагмента гена *cytb* мтДНК красных полевков в зоне влияния ВУРС показано, что внутривоупуляционное разнообразие на импактном и прилежащем фоновом участках выше такового у животных с удаленной референтной территории. Наиболее высокие значения индексов генетического разнообразия наблюдались у животных из зоны ВУРС и с сопредельного участка, взаимосвязанных миграционными отношениями. Полученные результаты приводят к заключению о радиогенном происхождении наблюдаемых эффектов (возрастании индексов генетического разнообразия, оцененных по молекулярным маркерам – изменчивости мтДНК и микросателлитной ДНК). Генетическая дифференциация исследуемых группировок в значительной степени обусловлена хроническим радиационным воздействием, которое можно рассматривать в качестве экологического фактора, способного влиять на генетическую структуру популяции.

Из полученных результатов следует, что мтДНК является чувствительным маркером радиационного воздействия и свидетельствует о мутационном процессе, идущем в популяциях мелких млекопитающих, населяющих в зону влияния ВУРС.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭРиЖ УрО РАН (№ 122021000077–6).

#### Литература

1. Газиев А.И., Подлущий А.Я. Низкая эффективность систем репарации ДНК в митохондриях // Цитология. 2003. Т. 45. № 4. С. 403–417.
2. Baker R.J., Dickins B., Wickliffe J.K. et al. Elevated mitochondrial genome variation after 50 generations of radiation exposure in a wild rodent // *Evolutionary Applications*. 2017. V. 10. P. 784–791.
3. Molchanova I., Mikhailovskaya L., Antonov K. et al. Current assessment of integrated content of long-lived radionuclides in soils of the head part of the East Ural Radioactive Trace // *J. Environ. Radioact.* 2014. V. 138. N. 6. P. 238–248. [www.elsevier.com/locate/jenvrad](http://www.elsevier.com/locate/jenvrad)
4. Rakitin S.B., Grigorkina E.B., Olenev G.V. Analysis of microsatellite DNA in rodents from Eastern Urals radioactive trace zone and contiguous territories. *Russ. J. Genet.* 2016. V. 52. N. 4. P. 398–404. doi: 10.1134/S1022795416030121
5. Malinovsky G.P., Yarmoshenko I.V., Starichenko V.I. et al. Assessment of radiation exposure of murine rodents at the EURT territories // *Central European Journal of Biology*. 2014. V. 9. N. 10. P. 960–966. doi: 10.2478/s11535-014-0321-2
6. Sources effects and risks of ionizing radiation. UNSCEAR 2008 Report to General Assembly with Scientific Annexes. New York: UNSCEAR. 2011. 219 p.
7. Grigorkina E.B., Olenev G.V. Migrations of rodents in the zone of local radioactive contamination at different phases of population dynamics and their consequences // *Biology Bulletin*. 2018. V. 45. N. 1. P. 110–118. doi: 10.1134/S1062359018010041

## ИНДУКЦИЯ ГЕННЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ МУТАЦИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И УСКОРЕННЫХ ИОНОВ АЗОТА В ГАПЛОИДНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

*Н. И. Жучкина, Н. В. Шванева, Н. А. Колтова*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

[gem\\_nadin@bk.ru](mailto:gem_nadin@bk.ru)

*Резюме.* Изучение закономерностей индукции генных мутаций показало, что частота возникновения мутаций зависела от ЛПЭ. ОБЭ мутагенного действия от ЛПЭ для мутаций сдвига рамки считывания и прямых мутаций представляла собой кривую с локальным максимумом около 100 кэВ/мкм. Редко ионизирующее излучение вызывало замены оснований более эффективно, чем ускоренные тяжелые ионы. Тяжелые ионы вызывали более эффективно делеции и комплексные мутации.

*Ключевые слова:*  $\gamma$ -лучи, тяжелые ионы, генные мутации, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INDUCTION OF GENE AND COMPLEX MUTATIONS BY GAMMA-RAYS AND ACCELERATED NITROGEN IONS IN HAPLOID EUKARYOTIC CELLS

*N. I. Zhuchkina, N. V. Shvaneva, N. A. Koltovaya*

Joint Institute for Nuclear Research, Joliot-Curie 6, 141980 Dubna, Russia

[gem\\_nadin@bk.ru](mailto:gem_nadin@bk.ru)

*Summary.* A study of the patterns of induction of gene mutations showed that the frequency of mutations depended on LET. The RBE of mutagenic effect from LET for frameshift mutations and direct mutations was a curve with a local maximum of about 100 keV/ $\mu$ m. Rarely has ionizing radiation caused base substitutions more efficiently than accelerated heavy ions. Heavy ions caused deletions and complex mutations more effectively.

*Keywords:*  $\gamma$ -rays, heavy ions, point and complex mutations, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Воздействие ионизирующего излучения приводит к возникновению различных повреждений ДНК, приводящих к мутациям, перестройкам и гибели клеток. Возникающие в клетках первичные повреждения – двунитевые и однонитевые разрывы, поперечные сшивки, модификации оснований – нарушают матричные процессы и приводят к возникновению мутаций. Гомологичная рекомбинация устраняет одно- и двунитевые разрывы. Хотя долгое время она считалась безошибочной, но в последнее время было показано, что в результате гомологичной рекомбинации могут возникнуть небольшие мутации (точечные мутации, сдвиг рамки считывания, небольшие делеции и инсерции) [1]. Репарация двунитевых разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов также может приводить к вставке или потере нескольких нуклеотидов. Большой вклад в процесс возникновения мутаций вносят вторичные повреждения, возникающие в результате действия активных форм кислорода.

Консервативность базовых молекулярных клеточных процессов, в том числе репарационных, делает возможным использование модельных эукариотических систем. Одной из наиболее привлекательных моделей в биологических исследованиях служат одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Они хорошо генетически охарактеризованы и представляют собой подходящую базу для анализа мутаций, молекулярную природу которых в настоящее время позволяют детально изучить методы, использующие полимеразную цепную реакцию и секвенирование. В данной

работе изучали закономерности индукции генных мутаций в гаплоидных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием редко- и плотно-ионизирующих излучений на базовых установках ОИЯИ.

Для тестирования замен пар оснований использовали коллекцию из шести штаммов, которые отличаются друг от друга только заменами отдельных оснований в кодоне критической аминокислоты – глутамина Glu50 в гене *TRP5* [2]. Данная генетическая система позволяет тестировать все типы транзиций и трансверсий. Ранее было показано, что при облучении всех шести штаммов гамма-лучами наиболее эффективно индуцировались транзиции GC-AT [3], поэтому в дальнейшей работе с тяжёлыми ионами в виду ограниченности возможностей тестировали именно эту мутацию. Этот же штамм использовали при анализе возникновения прямых мутаций различной молекулярной природы в гене аргинин пермиазы *CAN1*, нарушение которого вызывает устойчивость к аналогу аргинина канаванину. Мутации сдвига рамки считывания тестировали с помощью штамма, несущего +4-мутацию сдвига рамки считывания *lys2-BglI* в гене *LYS2*. Восстановление рамки считывания в данном штамме происходит в результате выпадения или вставки нуклеотидов, число которых не кратно трем, преимущественно в трэках 5A или 4C [4].

Источником  $\gamma$ -излучения служил терапевтический аппарат «Рокус» ( $^{60}\text{Co}$ , 0,25 кэВ/мкм, 0,7 Гр/мин). Ускоренные пучки ионов азота  $^{15}\text{N}$  с ЛПЭ в 67, 92, 108, 124 и 177 кэВ/мкм получали на циклотроне У-400М. Облучение проводили в дозах до 80 Гр.

Для исследуемых штаммов наблюдалась характерная для гаплоидных штаммов экспоненциальная зависимость выживаемости от дозы облучения. Зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) летального действия от линейной передачи энергии (ЛПЭ) представляли собой кривые с максимумом около 100 кэВ/мкм для обоих облучаемых штаммов.

При облучении  $\gamma$ -лучами и ионами азота исследуемых штаммов частота возникновения генных мутаций росла с увеличением дозы и при дозе 80 Гр была выше, чем в контроле: в 11-14 раз для прямых мутаций, в 5-10 раз для мутаций сдвига рамки считывания и в 4-7 раз для транзиций. Зависимость ОБЭ мутагенного действия от ЛПЭ для мутаций сдвига рамки считывания и прямых мутаций представляла собой кривую с локальным максимумом около 100 кэВ/мкм. В рамках использованных нами значений ЛПЭ максимальные значения ОБЭ составляли для прямых мутаций  $2,3 \pm 0,3$  при ЛПЭ 108 кэВ/мкм и для мутаций сдвига рамки считывания –  $3,3 \pm 0,4$  при ЛПЭ 67 кэВ/мкм. При индукции замен пар оснований частота мутаций практически не зависела от ЛПЭ, исключение составила ЛПЭ 177 кэВ/мкм, при которой индукция транзиций снижается.

Из расщепов необлученных и облученных ( $\gamma$ -лучами и ионами азота с ЛПЭ 67 кэВ/мкм в двух дозах 20 и 80 Гр) культур отбирали мутанты. Для анализа природы мутаций индуцированных в генах *CAN1* и *LYS2* проводили секвенирование.

При исследовании спектра генных мутаций в гене *CAN1* проанализировали 144 спонтанных и индуцированных  $\gamma$ -излучением и тяжёлыми ионами мутантов. Были выявлены различные типы мутаций: транзиции, трансверсии, инсерции, инверсии, делеции и комплексные мутации, состоящие преимущественно из замены основания и небольшой делеции в пределах одного витка ДНК. Анализ спектра показал, что в контроле преобладали замены пар оснований, число комплексных мутаций по сравнению с ними было незначительно. При воздействии  $\gamma$ -лучами и тяжёлыми ионами картина менялась: снижалось число замен пар оснований, а число комплексных мутаций росло. Также заметно, что  $\gamma$ -лучи более эффективно индуцировали замены оснований, чем тяжёлые ионы, которые, в свою очередь, более эффективно индуцировали делеции и сложные мутации. Статистически значимым было только уменьшение замен пар оснований после облучения ионами азота в дозе 80 Гр (точный



критерий Фишера,  $p < 0,05$ ). Анализ замен пар оснований, выявленных при секвенировании гена *CAN1*, показал, что наиболее эффективно при облучении индуцировались транзиции GC-AT и трансверсии GC-TA и AT-TA, что совпадает с данными полученными при облучении  $\gamma$ -лучами коллекции мутантных штаммов *trp5*.

Для тестирования мутаций сдвига рамки считывания использовали мутацию сдвига рамки *lys2-BglI*. Это специфическая система, позволяющая выявлять только определенные мутации и в определенном участке. В гене *lys2-BglI* для возникновения мутаций со сдвигом рамки считывания есть ограничения, реверсии могут возникать только в «открытом окне» вблизи инсерции и они ограничены спецификой последовательности в этом регионе [4]. Было выделено 65 независимых *Lys+*-мутантов, индуцированных тяжелыми ионами, у которых амплифицировали и секвенировали нуклеотидные последовательности гена *LYS2* в положении 171-696. Анализ показал, что в случае мутации *lys2-BglI* «открытое окно» представляет собой область размером 182 п.о. (основания 318–500), ограниченную терминирующими кодонами, фланкирующими мутацию *lys2-BglI*. Проанализированные реверсии возникали за счет  $\Delta 1$ -делеций (72–79 %) и комплексных мутаций (21–28 %). Причем делеции одной пары оснований происходили в полинуклеотидных участках. Комплексные мутации часто включали две соседние мутации, чаще всего одиночную делецию и замену основания. Этот спектр был одинаковым при спонтанных мутациях и после облучения ионами азота (67 кэВ/мкм), но комплексные мутации включали крупные делеции, которые чаще встречались в последнем случае и отсутствовали в спектре прямых мутаций в гене *CAN1*.

Таким образом, было показано, что при воздействии ионизирующей радиации спектр мутаций, возникающих в генах *CAN1* и *LYS2*, меняется по сравнению со спонтанным фоном. В гене *CAN1* наблюдается снижение числа замен пар оснований и возрастание числа комплексных мутаций. В гене *LYS2* заметный рост числа комплексных мутаций не наблюдается и чаще встречаются протяжённые делеции, возможно, за счет специфики используемой системы.

#### Список литературы:

1. McVey M, Khodaverdian VY, Meyer D, Cerqueira PG, Heye W-D. *Annu Rev Genet.* 2016. т 23; 50: 393–421.
2. Williams T-M, Fabbri RM, Reeves JW, Crouse GF. *Genetics.* 2005. 170:1423-1426.
3. Koltovaya NA, Zhuchkina NI, Lyubimova KA. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences/* 2018. v. 12, N 9, p. 266-271.
4. Tishkoff DX, Filosi N, Gaida GM, Kolodner RD. *Cell.* 1997. 88:253-263.

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СОЧЕТАННОГО  
ДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ПУЛ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ IN VITRO**

*Замулаева И.А.<sup>1,2</sup>, Матчук О.Н.<sup>1,2</sup>, Якимова А.О.<sup>1</sup>, Корякин С.Н.<sup>1,3</sup>, Пикалов В.А.<sup>4</sup>,  
Иванов С.А.<sup>1,5</sup>*

<sup>1</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

<sup>2</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>3</sup> Обнинский институт атомной энергетики – филиал «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия

<sup>4</sup> Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Протвино, Россия

<sup>5</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, Россия  
e-mail: [zamuraeva@mail.ru](mailto:zamuraeva@mail.ru)

*Резюме.* Эффекты сочетанного действия протонов и ионов  $^{12}\text{C}^{6+}$  на пул опухолевых стволовых клеток (ОСК) зависят от молекулярного подтипа рака молочной железы. Наилучший результат в плане снижения абсолютного количества ОСК получен в случае последовательного облучения ионами углерода, затем протонами при их одинаковом вкладе в суммарную эквивалентную дозу. Для линии люминального подтипа показана зависимость пострадиационного количества ОСК от экспрессии генов *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG*.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, опухолевые стволовые клетки, экспрессия генов, протоны, ионы углерода

**MOLECULAR AND CELLULAR REGULARITIES OF COMBINED ACTION OF  
PROTONS AND CARBON IONS ON BREAST CANCER STEM CELLS  
IN CELL CULTURES IN VITRO**

*Zamuraeva I.A.<sup>1,2</sup>, Matchuk O.N.<sup>1,2</sup>, Yakimova A.O.<sup>1</sup>, Koryakin S.N.<sup>1,3</sup>, Pikalov V.A.<sup>4</sup>,  
S.A. Ivanov<sup>1,5</sup>*

<sup>1</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Center - Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

<sup>2</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>3</sup> Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering - Branch of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

<sup>4</sup> Institute of High Energy Physics Named by A.A. Logunov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Protvino, Russia

<sup>5</sup> RUDN University, Moscow, Russia

*Summary.* The effects of combined action of protons and  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions on pool of cancer stem cells (CSCs) depend on molecular subtype of breast cancer. The best result in terms of reducing the CSC absolute number was obtained in case of successive irradiation with carbon ions, then with protons with their equal contribution to the total equieffective dose. For luminal subtype, the dependence of postradiation number of CSCs on the expression of genes *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG* was shown.

*Keywords:* breast cancer, cancer stem cells, gene expression, protons, carbon ions

Одним из наиболее перспективных направлений развития лучевой терапии является использование ускоренных заряженных частиц (прежде всего протонов и ионов углерода) для лечения онкологических заболеваний. Благодаря особому

пространственному распределению дозы ионизирующего излучения с максимальной потерей энергии частиц в конце траектории их движения (т.н. пике Брэгга), потоки заряженных частиц обеспечивают облучение опухолевой ткани без превышения толерантных доз для нормальных тканей, даже если мишень вплотную прилегает к критическим структурам организма. Однако относительная биологическая эффективность (ОБЭ) протонного излучения в плане элиминации злокачественных новообразований невелика и, по мнению большинства специалистов, лишь в 1,1 раза превышает эффективность фотонного излучения [1], что не позволяет преодолеть радиорезистентность части опухолей и в ряде случаев приводит к неудовлетворительным клиническим результатам лечения. ОБЭ ионов углерода значительно выше, составляя обычно 2,5-3 и даже до 5 по данным разных авторов в зависимости от энергии частиц, дозы, типа клеток и др. [2]. Но в этом случае спектр вторичного излучения меняется на протяжении всего пробега первичных ионов, что создает неравномерное по биологической дозе поле облучения и приводит к необходимости использовать несколько направлений облучения.

Как правило, пучки протонов и ионов углерода используются в режиме монотерапии, в том числе для лечения рака молочной железы (РМЖ). Но в последнее время развивается идея об их совместном использовании для лечения, прежде всего радиорезистентных опухолей, близко расположенных к жизненно важным органам [3,4]. При этом следует отметить, что эффекты сочетанного действия протонов и ионов  $^{12}\text{C}$  на молекулярном и клеточном уровнях практически не изучены. Особенно важно понимать закономерности и механизмы ответа на такое сочетанное радиационное воздействие опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают более высокой резистентностью к традиционным противоопухолевым воздействиям ( $\gamma$ -, рентгеновскому излучению и многим химиопрепаратам) по сравнению с остальной массой опухолевых клеток. Полагают, что именно сохранение ОСК после противоопухолевой терапии приводит к рецидивированию опухолевого процесса у части больных и метастазированию [5].

Целью работы является оценка изменений пула ОСК молочной железы и экспрессии генов, потенциально связанных с пострадиационным формированием пула ОСК, после сочетанного воздействия протонов и ионов углерода (в обеих последовательностях) с одинаковым и разным вкладом излучений в суммарную дозу *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе изучен радиационный ответ ОСК двух клеточных линий РМЖ: MCF-7 люминального А подтипа (ER+PrR+ HER2neu-) и MDA-MB-231, представляющей т.н. тройной негативный подтип (ER-PrR- HER2neu-). Выбор указанных клеточных линий обусловлен тем, что люминальный подтип является наиболее часто встречающимся среди случаев РМЖ, а тройной негативный – наиболее агрессивным.

Клетки линии MCF-7, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), и MDA-MB-231 из Американской типовой коллекции клеточных культур (Вирджиния, США) культивировали в стандартных условиях *in vitro*. Клетки в логарифмической стадии роста подвергали воздействию пучка протонов в активно-модулированном пике Брэгга (энергии протонов 67-83 МэВ) на комплексе протонной терапии «Прометеус» (АО «Протом», Россия). Облучение ионами углерода  $^{12}\text{C}^{6+}$  с начальной энергией 400 МэВ/нуклон, проводили в пике Брэгга, модифицированном посредством гребенчатого фильтра, на установке Института физики высоких энергий имени А.А. Логунова НИЦ «Курчатовский институт». Указанные излучения использовали по отдельности или в сочетании друг с другом в последовательностях «Ионы углерода - протоны» и

«Протоны - ионы углерода» при одинаковом и разном вкладе ионизирующих излучений в суммарную эквивалентную дозу (ЭКД) 4Гр с интервалом 4-6 ч между сеансами облучения. Расчет вклада каждого излучения в ЭКД производился с учетом ОБЭ протонов и ионов углерода, принятых за 1,0 и 2,0, соответственно.

Идентификацию и количественную оценку ОСК выполняли через 48 ч после облучения с помощью проточной цитометрии по иммунофенотипу CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup>, который наиболее часто используется в различных исследованиях для выявления ОСК РМЖ.

С помощью метода ПЦР в режиме реального времени определяли относительный уровень экспрессии генов нескольких частично перекрывающихся функциональных групп, потенциально связанных с формированием пула ОСК после облучения: 1) Маркеры ОСК, регуляция стволового состояния (*NANOG*, *OCT4*, *SNAIL*, *SLUG*); 2) Маркеры и регуляция процесса эпителиально-мезенхимальной транзиции (*VIM*, *OCLN*, *CDH1*, *CDH2*, *SNAIL*, *SLUG*); 3) Гибель клеток (про- и антиапоптотические факторы, аутофагия) (*BCL2*, *BAX*, *CHOP*, *BECLIN1*); 4) Контроль клеточного цикла и репарация повреждений ДНК (*GADD45A*, *FEN1*, *PRKDC*). Через 24 ч после облучения клетки лизировали и выделяли РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора «MMLV RT» (Евроген, Россия). Дизайн геноспецифических праймеров выполняли при помощи онлайн-сервиса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), синтез праймеров осуществляла компания «Бигль» (Россия). Анализ уровня экспрессии генов осуществляли на амплификаторе «Rotor Gene» («Corbet Research», Австралия) с использованием набора реагентов qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. В качестве референса была выбрана комбинация генов «домашнего хозяйства» *GAPDH* и *IPO8*. Обработку данных для оценки уровня экспрессии каждого из исследуемых генов проводили методом ΔΔCt.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программ «Origin 6.0» (Microcal Software, Inc.) и «Statistica 6.0» (StatSoft., Inc.).

**Результаты и обсуждение.** Среднее количество (±SE) ОСК линии MCF-7 в контроле составляло 0,29±0,04% и статистически значимо не менялось при одиночном действии протонов и ионов <sup>12</sup>C в ЭКД 2,0Гр. Эффекты сочетанного облучения этой клеточной культуры зависели от последовательности воздействия ионизирующих излучений: относительное количество ОСК увеличивалось при облучении протонами, потом ионами углерода, и не изменялось в случае обратной последовательности. Наиболее благоприятный результат в плане элиминации ОСК (по критерию уменьшения их абсолютного количества) зарегистрирован в случае последовательного облучения ионами углерода - протонами и при их одинаковом вкладе в суммарную ЭКД: после сочетанного облучения в таком варианте абсолютное количество ОСК в среднем уменьшалось в 2,1 раза по сравнению с контролем (p<0,05).

Контрольный уровень относительного количества ОСК линии MDA-MB-231 был существенно выше, чем в культуре MCF-7 (p<0,0001), составляя в среднем 76,3±2,0%. Установлено статистически значимое уменьшение как относительного, так и абсолютного количества ОСК этой линии при всех вариантах одиночных и сочетанных воздействий. Так, абсолютное количество ОСК этой линии уменьшалось под влиянием всех вариантов облучения в 1,7-2,8 раза по сравнению с контролем (p<0,01).

В целом, отмечена широкая вариабельность относительного количества ОСК после использованных вариантов радиационного воздействия: в культуре MCF-7 этот показатель варьировал от 0,25% до 0,93%, в культуре MDA-MB-231 - от 52,2% до

68,2%. Выполнен множественный регрессионный анализ зависимости относительного количества ОСК линии MCF-7 от уровня экспрессии 15 генов, исследованных в работе. В результате была построена статистически значимая модель, для которой коэффициент множественной корреляции R составил 0,99 при  $p < 0,00013$ . В модель вошли показатели экспрессии следующих генов: *BCL2* (стандартизированный угловой коэффициент регрессии  $\beta = -3,48$ ,  $p = 0,000076$ ), *PRKDC* ( $\beta = 7,54$ ,  $p = 0,000062$ ), *CHOP* ( $\beta = 3,28$ ,  $p = 0,000062$ ), *CDH2* ( $\beta = -1,88$ ,  $p = 0,000089$ ), *BECLINI* ( $\beta = 0,59$ ,  $p = 0,000184$ ), *SLUG* ( $\beta = -0,23$ ,  $p = 0,000469$ ). Таким образом, в результате множественного регрессионного анализа выявлено 6 генов, экспрессия которых влияет на пострадиационное количество ОСК. Отобранные программой гены относятся ко всем анализируемым функциональным группам, но больше всего генов, которые связаны с клеточной гибелью.

Для ОСК линии MDA-MB-231 статистически значимой модели множественной регрессии построить не удалось ( $R = 0,81$ ,  $p = 0,07$ ), хотя программа автоматически выделила 2 показателя (экспрессия генов *NANOG* и *FENI*), наиболее тесно (хотя и статистически незначимо) связанных с количеством ОСК.

Таким образом, можно заключить, что:

1. Эффекты сочетанного действия протонов и ионов  $^{12}\text{C}$  на ОСК зависят от молекулярного подтипа РМЖ.
2. Наиболее негативный результат (увеличение абсолютного количества ОСК) получен в случае РМЖ люминального молекулярного подтипа (линия MCF-7) при последовательном облучении протонами, затем ионами  $^{12}\text{C}$  при их вкладе в суммарную ЭКД 80:20%, соответственно.
3. Наиболее позитивный результат в плане снижения абсолютного количества ОСК (в 2,1-2,6 раз по сравнению с контролем) получен в обеих клеточных культурах РМЖ в случае последовательного облучения ионами  $^{12}\text{C}$ , а затем протонами при их одинаковом вкладе в суммарную ЭКД.
4. Пострадиационное количество ОСК линии MCF-7 зависит от уровня экспрессии генов *BCL2*, *PRKDC*, *CHOP*, *CDH2*, *BECLINI*, *SLUG*, как показано с помощью множественного регрессионного анализа. В то же время, изменение количества ОСК линии MDA-MB-231 не связано с изменением активности проанализированных генов, что указывает на отличия в регуляции ответа клеток MCF-7 и MDA-MB-231 на радиационное воздействие на молекулярном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1347.

#### **Литература:**

1. Ebner D.K., Malouff T.D., Frank S.J., Koto M. The Role of Particle Therapy in Adenoid Cystic Carcinoma and Mucosal Melanoma of the Head and Neck//Int J Part Ther, 2021, V. 8, P. 273-284.
2. Loap P., De Marzi L., Almeida C.E., Barcellini A., Bradley J., de Santis M.C., Dendale R., Jimenez R., Orlandi E., Kirova Y. Hadrontherapy techniques for breast cancer//Crit Rev Oncol Hematol, 2022, V. 169: 103574.
3. Durante M., Debus J., Loeffler J.S. Physics and biomedical challenges of cancer therapy with accelerated heavy ions // Nat Rev Phys, 2021, V.3, P. 777-790.
4. Kopp B., Mein S., Dokic I., Harrabi S., Böhlen T. T., Haberer T., Debus J., Abdollahi A., Mairani A. Development and Validation of Single Field Multi-Ion Particle Therapy Treatments//Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020, V.106, P. 194-205.
5. Olivares-Urbano M. A., Griñán-Lisón C., Marchal J. A., Núñez M. I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer//Cells, 2020, V.9: 1651.

## ИЗМЕНЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

*В.Н. Ильичева<sup>1</sup>, И.Б. Ушаков<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко» Минздравсоцразвития России, г. Воронеж, Россия  
e-mail: veravgma@yandex.ru

<sup>2</sup>Государственный научный центр – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

*Резюме.* В результате проведенного эксперимента на крысах-самцах после общего однократного облучения в дозе 0,1 Гр выявлена зависимость изменений карิโอметрических показателей, активности окислительно-восстановительных ферментов, содержания ДНК от филогенетического возраста коры и времени после воздействия.

*Ключевые слова:* малые дозы радиационного воздействия, головной мозг, ядерная ДНК

## CHANGES IN VARIOUS PARTS OF THE CEREBRAL CORTEX UNDER THE ACTION OF IONIZING RADIATION

*V.N. Ilyicheva<sup>1</sup>, I.B. Ushakov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>GBOU NPE "Voronezh State Medical Academy named after N. N. Burdenko" Ministry of Health and Social Development of Russia, Voronezh, Russia  
e-mail: veravgma@yandex.ru

<sup>2</sup>State Scientific Center – A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia, Moscow, Russia

*Summary.* As a result of the experiment conducted on male rats after a total single irradiation at a dose of 0.1 Gy, the dependence of changes in karyometric parameters, the activity of redox enzymes, DNA content on the phylogenetic age of the bark and time after exposure was revealed.

*Keywords:* small doses of radiation exposure, brain, nuclear DNA

Приоритетной проблемой авиационной и космической медицины в настоящее время является изучение реакции ЦНС на экстремальные факторы, дестабилизирующие функциональные возможности мозга. В настоящее время внимание радиобиологов направлено на диапазон доз, превышающих естественный радиационный фон, но не вызывающих острого радиационного поражения, т. е. малых доз [4,5].

**Материал и методы исследования.** Эксперимент проведен на 70 половозрелых крысах-самцах массой 200–230 г, которые подвергались общему равномерному однократному гамма-облучению (спектр 1,2 МэВ) в дозе 0,1 Гр, мощностью 50 сГр/ч на базе ГНИИИ ВМ МО РФ (г. Москва). Взятие материала производилось через 1 сутки, 6, 12 и 18 мес после воздействия. Протокол экспериментов в разделах выбора, содержания животных и выведения их из опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики, которые представлены в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Карацци–эозином для обзорных целей, а для изучения цитоархитектоники – метиленовым синим по Нисслю. На срезах изучали по 300 нейроцитов во вторичной моторной коре, прелимбической коре, гиппокампе (поля CA<sub>1</sub>–CA<sub>4</sub>) и зубчатой фасции, пирIFORMНОЙ зоне древней коры согласно

цитоархитектоническим картам, учитывая морфологическую изменчивость нейроцитов, тинкториальные свойства клеток, степень дифференцировки ядра и ядрышка и их линейные размеры; рассчитывали ядерно-цитоплазматический (ЯЦИ) и ядрышко-ядерный (ЯЯИ) индексы. Выявление активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), и щелочной фосфомоноэстеразы (ЩФ) проводились на криостатных срезах толщиной 10 мкм. Транспортная функция эндотелия сосудов оценивалась на основании активности ЩФ с помощью стереологического метода точечного счёта. Количественную оценку остальных ферментов в микропрепаратах определяли по величине оптической плотности конечных продуктов гистохимических реакций в видимой части спектра. Результаты обрабатывались статистически.

**Результаты исследования и их обсуждение.** После воздействия облучения во всех изучаемых отделах ЦНС развиваются однотипные морфофункциональные изменения нейронов, отличающиеся соотношением различных типов морфологической изменчивости, что позволило в пострadiaционном периоде выделить 3 стадии [1,2]: начальных проявлений, выраженных изменений, восстановления. В фазу начальных проявлений после воздействия ионизирующего излучения в дозе 0,1 Гр в исследуемых зонах коры головного мозга преобладают пограничные формы морфологической изменчивости нервных клеток, сопровождающиеся незначительным изменением биосинтетических и биоэнергетических процессов. В этой стадии происходит незначительное увеличение содержания ДНК по сравнению с контрольными показателями на 4,5%, 3,15% и 1,5% в новой, старой и древней коре, соответственно, а также снижение концентрации общего белка на 7,5%, 5,3% и 3,4% в структурах нео-, архи- и палеокортекса, соответственно. По данным [5], в средних слоях теменной коры воздействие изучаемого фактора не вызвало изменений окислительно-восстановительных процессов на протяжении всего пострadiaционного периода. Таким образом, наличие нервных клеток с пограничными и деструктивными изменениями, выявляющиеся в ранние сроки после воздействия, свидетельствует о дестабилизирующем действии ионизирующего излучения на кору изучаемых зон нервной системы. Во вторую стадию при однократном воздействии облучения в дозе 0,1 Гр в различных отделах коры головного мозга в нейронах развиваются альтеративные изменения, проявляющиеся в виде коагуляционного и колликвационного нейроннекрозов. Однако, это сопровождается повышением ДНК и общего белка, что свидетельствует об активации биосинтетических процессов. Снижение активности ЩФ в эндотелии капилляров, наблюдающееся в этом периоде, носит фазный характер. Снижение активности ключевых ферментов цикла лимонной кислоты и гликолиза сопряжено с активацией пентозофосфатного пути утилизации глюкозы. Схожая динамика изменений, но менее выраженная наблюдается в пириформной зоне древней коры и в гиппокампе. При этом наблюдается увеличение содержания ДНК и общего белка более выраженное во вторичной моторной коре (на 9% и 11% по сравнению с контролем, соответственно). Однако в зубчатой фасции, как в наиболее стабильной структуре старой коры, при данном воздействии значимых изменений в указанный период не происходило. Полученные данные согласуются с результатами, проведенных ранее исследований и дополняют их [1,2]. В работе [5] при аналогичных условиях в средних слоях коры теменной доли наблюдались увеличение объема нейронов и их ядер, снижение показателей ЯЦИ и ЯЯИ. В третью фазу, продолжающуюся до 18 мес после облучения, происходит постепенная нормализация соотношения различных морфологических типов нейроцитов, их цито- и карнометрических показателей, активности окислительно-восстановительных ферментов, содержания ДНК и общего белка, активности ЩФ. Компенсаторные

механизмы способствуют стабилизации изменений в ранние сроки в филогенетически старых отделах коры, к 12 мес после воздействия экспериментального фактора. В филогенетически молодых зонах коры (вторичная моторная и прелимбическая) все исследуемые показатели близки к исходному уровню, но полного восстановления в указанных отделах мозга не происходит. В стадии восстановления преобладают адаптационные изменения, которые находятся в пределе физиологической изменчивости нейроцитов, незначительно отличающейся от биологического контроля, отражающей различные уровни функциональной активности клеток. Полученные данные согласуются с результатами проведенных исследований [3,4,5].

**Выводы.** Следовательно, однократное общее облучение в дозе 0,1 Гр является раздражающим фактором в нейроцитах различных зон коры, который вызывает однотипные изменения размеров нервных клеток, карิโอметрических показателей, активности окислительно-восстановительных ферментов, содержания ДНК и общего белка, проницаемости капилляров. Характер изменений зависит от филогенетического возраста коры и времени после воздействия. Более значимые изменения в нейроцитах происходят в период начальных проявлений в филогенетически молодых отделах коры, они нивелируются в период выраженных изменений и в конце срока наблюдения незначительно отличаются от контрольного уровня, тогда, как в филогенетически старых зонах коры возникающие изменения компенсируются в более ранние сроки.

#### Список литературы

1. Ильичева, В. Н. Влияние ионизирующего излучения на энергетический обмен в различных отделах коры головного мозга / В. Н. Ильичева, Б. Н. Ушаков // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2013. – Т. 21, № 1. – С. 30-36. – EDN PYEFLP.
2. Ильичева, В. Н. Сравнительная гистохимическая характеристика различных зон коры головного мозга крыс после облучения / В. Н. Ильичева // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2011. – Т. 19, № 4. – С. 8-12. – EDN OYJZWZ.
3. Моделирование изменений в коре головного мозга при малых радиационных воздействиях / О. П. Гундарова, В. П. Федоров, А. Г. Кварацхелия, Н. В. Маслов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 15-26. – DOI 10.18499/2225-7357-2022-11-2-15-26. – EDN QONPZG.
4. Соколов, Д. А. Влияние ионизирующего излучения на энергетический метаболизм старой и древней коры головного мозга крыс / Д. А. Соколов, В. Н. Ильичева, Н. А. Насонова // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2015. – Т. 4, № 3. – С. 113. – EDN VOBBUR.
5. Сравнительная характеристика изменений нейронов головного мозга при однократном и пролонгированном радиационном воздействии / О. П. Гундарова, В. П. Федоров, А. Г. Кварацхелия, Н. В. Маслов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 35-46. – DOI 10.18499/2225-7357-2021-10-3-35-46. – EDN RLKGCCL.



**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ  
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОМА У РАБОТНИКОВ,  
ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ**

*Д.С. Исубакова<sup>1</sup>, О.С. Цымбал<sup>1</sup>, Н.В. Литвяков<sup>1,2</sup>,  
М.Ю. Цыпленкова<sup>1</sup>, И.В. Мильто<sup>1,3</sup>, Р.М. Тахауов<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Северский биофизический научный центр

Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального  
исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

e-mail: [mail@sbrc.seversk.ru](mailto:mail@sbrc.seversk.ru)

*Резюме.* Представлены результаты изучения связи однонуклеотидных полиморфизмов генов эпигенетической регуляции генома с повышенной частотой цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения, подвергавшихся в процессе своей трудовой деятельности длительному радиационному воздействию в дозах 100-500 мЗв. Установлена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма гена *DNMT3A rs7590760* с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения. Все остальные изученные типы цитогенетических нарушений не показали статистической значимости.

*Ключевые слова:* ионизирующее излучение, хромосомные aberrации, однонуклеотидный полиморфизм, *DNMT3A*.

**STUDY OF POLYMORPHISM OF GENES  
OF EPIGENETIC REGULATION OF THE GENOME IN WORKERS  
EXPOSED TO LONG-TERM RADIATION EXPOSURE**

*D.S. Isubakova<sup>1</sup>, O.S. Tsybal<sup>1</sup>, N.V. Litviakov<sup>1,2</sup>,  
M.Yu. Tsyplenkova<sup>1</sup>, I.V. Milto<sup>1,3</sup>, R.M. Takhaouov<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia

<sup>2</sup>Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

<sup>3</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

*Summary.* The results of studying the relationship of single-nucleotide polymorphisms of genes of epigenetic regulation of the genome with an increased frequency of cytogenetic disorders in the blood lymphocytes of workers of the ionizing radiation facility exposed to prolonged radiation exposure at doses of 100-500 mSv. The association of *rs7590760* of the *DNMT3A* gene with a high frequency of dicentric and ring chromosomes in blood lymphocytes has been established. All other types of cytogenetic disorders showed no statistical significance.

*Key words:* ionizing radiation, chromosomal aberrations, single nucleotide polymorphism, *DNMT3A*.

Механизмы эпигенетической регуляции генома играют критическую роль в развитии и прогрессировании опухолей различных локализаций. Поскольку метилирование ДНК вовлечено во все клеточные процессы, то однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) генов эпигенетической системы регуляции генома, наряду с генами систем клеточной защиты, будут играть одну из ключевых ролей в

формировании индивидуальной радиочувствительности особи. Мутации и ОНП в генах, регулирующих процессы метилирования и деметилирования ДНК, наиболее хорошо изучены при злокачественных новообразованиях гематологической природы, их важная роль в развитии этих заболеваний на данный момент очевидна.

У человека метилирование ДНК обеспечивают ДНК-метилтрансферазы 1, 3а и 3б (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) [1], также активное участие в регуляции метилирования ДНК принимают белки семейства ТЕТ (метилцитозиновые диоксигеназы) [2].

Цель исследования – оценить связь ОНП генов эпигенетической регуляции генома с повышенной частотой цитогенетических нарушений (ЦН), возникших у работников объекта использования ионизирующего излучения (ОИИИ) под действием долговременного техногенного профессионального облучения ионизирующим излучением (ИИ) в диапазоне доз 100-500 мЗв.

### **Материал и методы**

Объектом исследования служила кровь 104 условно здоровых работников ОИИИ, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному внешнему облучению  $\gamma$ -излучением в дозах 100-500 мЗв, и 20 условно здоровых работников ОИИИ, не подвергавшихся облучению ИИ. Для постановки исследования использовали совокупность приемов генотипирования на ДНК-чипах, генотипирования с помощью ПЦР в режиме реального времени и рутинного цитогенетического анализа мононуклеарных лейкоцитов крови. Анализ данных проводили по рецессивной модели, которая выбрана согласно информационному критерию Акаике. Распределения генотипов в выборке соответствуют равновесию Харди – Вайнберга. Для оценки статистической значимости применяли непараметрический критерий Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ).

### **Результаты**

На первом этапе проведено широкогеномное исследование ассоциации 150 ОНП с высокой частотой ЦН у работников ОИИИ (37 человек), подвергавшихся облучению ИИ: медиана дозы –  $188,8 \pm 8,3$  мЗв, интерквартильный размах – 147,8-218,7 мЗв. В результате из 150 ОНП в окончательный статистический анализ было включено 53 ОНП. Затем выполнена оценка ассоциации высокой частоты радиационно-индуцированных ЦН в зависимости от ОНП исследованных генов эпигенетической регуляции генома. Ассоциация с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом установлена для 9 ОНП. На втором этапе проведена валидация выявленных 9 ОНП. Материалом служила кровь 67 работников ОИИИ, подвергавшихся облучению ИИ: медиана дозы – 193,08 мЗв, интерквартильный размах – 160,13-236,40 мЗв, а также контрольная группа работников ОИИИ, не подвергавшихся радиационному воздействию ( $n = 20$ ). С повышенной частотой маркеров радиационного воздействия – дицентрических и кольцевых хромосом связь установлена для *rs7590760* гена *DNMT3A*. Для других изученных типов ЦН не установлено ассоциации с проанализированными ОНП. Группа контроля во всех случаях не показала ассоциаций с повышенной частотой ЦН.

### **Обсуждение**

ОНП *rs7590760* находится в шестом интроне гена *DNMT3A*, который расположен на хромосоме 2p23.3, и оказывает влияние на его экспрессию. Yuan X.Q. et al. показали, что у пациентов с острым миелоидным лейкозом с генотипом CG/GG, как правило, экспрессия мРНК *DNMT3A* в 2,38 раза выше по сравнению с лицами с генотипом CC. Кроме того, анализ выживаемости показал, что индивидуумы с более низкой экспрессией *DNMT3A* имели более низкую среднюю выживаемость по сравнению с теми, у кого экспрессировался более высокий уровень *DNMT3A* [3].

Одновременное влияние полиморфизма *rs7590760* (генотип СС) и метилирования *DNMT3A* может оказывать значительное влияние на уровни *DNMT3A*, а его пониженная экспрессия может привести к снижению степени метилирования ДНК генов, участвующих в метаболизме креатинина [4]. На группе работников, подвергавшихся профессиональному шумовому воздействию, было показано, что доминантный генотип *rs7590760* ассоциирован с потерей слуха, индуцированной вредным воздействием шума [5]. При этом в других исследованиях связь с *rs7590760* была установлена на уровне тенденции [6, 7].

Нами выявлено, что для ОНП *DNMT3A rs7590760* носители рецессивного генотипа имели частоту кольцевых хромосом в 2 раза выше и дицентрических хромосом в 1,77 раза выше в сравнении с носителями доминантного генотипа при относительно одинаковых дозах внешнего облучения ИИ.

### **Выводы**

В результате проведенного исследования выявлен ОНП гена *DNMT3A – rs7590760*, который может рассматриваться в качестве потенциального маркера индивидуальной радиочувствительности человека. Для работников ОИИИ показано, что рецессивный генотип *rs7590760* ассоциирован с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом при хроническом профессиональном облучении ИИ в диапазоне доз 100-500 мЗв.

### **Список литературы**

- 1 Xie S. et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human *DNMT3* gene family // *Gene*. 1999. Vol. 236. No. 1. pp. 87-95. DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00252-8.
- 2 Максимова В.П. и др. Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях // *Успехи молекулярной онкологии*. 2022. Т. 9. № 4. С. 24-40. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-24-40.
- 3 Yuan X.Q. et al. Evaluation of *DNMT3A* genetic polymorphisms as outcome predictors in AML patients // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. No. 37. pp. 60555-60574. DOI: 10.18632/oncotarget.11143.
- 4 de Souza B.F. et al. DNA Methyltransferase Genes Are Associated with Oral Mucositis and Creatinine Levels in Oncopediatric Patients // *Genes*. 2023. Vol. 14., No. 6. P. 1136. DOI: 10.3390/genes14061136.
- 5 Guo H. et al. Association of *DNMT3a*'s single nucleotide polymorphisms with susceptibility to noise-induced hearing loss in Chinese workers // *Wei Sheng Yan Jiu*. 2018. Vol. 47. No. 4. pp. 638-643. Chinese.
- 6 Szczepańska M. et al. Polymorphic variants of *DNMT3A* and the risk of endometriosis // *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013. Vol. 166. No. 1. pp. 81-85. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.09.003.
- 7 Ait Boujmia O.K. et al. The influence of *DNMT3A* and *DNMT3B* gene polymorphisms on acute myeloid leukemia risk in a Moroccan population // *Curr Res Transl Med*. 2020. Vol. 68. No. 4. pp. 191-195. DOI: 10.1016/j.retram.2020.08.001.

## **Ki-67 В ДИАГНОСТИКЕ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОМЗГОВОГО ГЕМОПОЭЗА**

*Квачева Ю.Е.*

Государственный научный центр – Федеральный медицинский биофизический центр  
им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия  
e-mail: [fmcb@fmbamail.ru](mailto:fmcb@fmbamail.ru)

*Резюме:* Проведено исследование аутопсийных образцов костного мозга людей, погибших от острой лучевой болезни в результате аварии на Чернобыльской АЭС, с применением иммуногистохимических (моноклональные антитела к антигену Ki-67) и рутинных окрасок. Показана практическая значимость изучения иммунофенотипических маркеров клеточной пролиферации миелокариоцитов, определяемая существенным расширением диагностических возможностей по характеристике наиболее важного параметра пострadiационной регенерации костномозгового гемопоэза – величины пролиферативного пула.

*Ключевые слова:* Ki-67, пролиферация клеток, острая лучевая болезнь, костный мозг, иммуногистохимия

## **Ki-67 IN THE DIAGNOSIS OF POST-RADIATION BONE MARROW HEMATOPOIESIS RECOVERY**

*Kvacheva Yu.E.*

State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical  
Biological Agency, Moscow, Russia  
e-mail: [fmcb@fmbamail.ru](mailto:fmcb@fmbamail.ru)

*Summary:* Autopsy bone marrow specimens of persons who died from acute radiation sickness as a result of the Chernobyl NPP accident were examined with the use of immunohistochemical (monoclonal antibodies to the Ki-67 antigen) and routine techniques. It has been shown that investigation of immunophenotypic markers of myelokaryocyte cell proliferation is practically significant, which is determined by a significant expansion of diagnostic capabilities to characterize the most important parameter of the post-radiation bone marrow hematopoiesis recovery – the size of the proliferative pool.

*Key words:* Ki-67, cell proliferation, acute radiation sickness, bone marrow, immunohistochemistry

В диагностике радиационно индуцированных нарушений гемопоэза решающее значение имеют данные о состоянии и величине пролиферативного пула костного мозга, позволяющие «напрямую» судить об интенсивности и эффективности пострadiационного восстановления и выстраивать наиболее точные прогностические оценки. В этой связи актуальными представляются исследования иммуноморфологических маркеров клеточной пролиферации, детекция которых получила широкое распространение в нерадиационной патологии, однако, до настоящего времени не внедрена в рабочий арсенал диагностических технологий радиационных патологов. Целью настоящей работы явилась иммуноморфологическая оценка *in situ* в костном мозге регенераторного потенциала гемопоэза по экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 у людей с острой лучевой болезнью.

### **Материалы и методы**

С применением иммуногистохимических (моноклональные антитела к антигену Ki-67, клон М1В-1, DAKO) и рутинных (гематоксилин-эозин, азурII-эозин) окрасок

проведено гистологическое и гистоморфометрическое исследование образцов костного мозга, отобранных при аутопсиях 27 лиц, подвергшихся общему внешнему относительно равномерному гамма- / бета-облучению (3,7-13,7 Гр) в результате аварии на Чернобыльской АЭС и погибших от острой лучевой болезни тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести на 14-96-е сутки после радиационного воздействия. Для количественной оценки пролиферативной активности миелокариоцитов определяли индекс меченя Ki-67 и митотический индекс (выраженное в процентах отношение количества иммунопозитивно окрашенных ядер и количества митотических фигур к общему количеству ядер клеток, наблюдаемых в стандартном поле зрения микроскопа) соответственно при иммуногистохимическом и рутинном исследованиях серийных гистологических срезов костного мозга.

### **Результаты и обсуждение**

Выбор в качестве маркера клеточной пролиферации антигена Ki-67 (MIB-1), синтез которого начинается в G1-фазе и увеличивается в S и G2-фазах клеточного цикла, обосновывался данными литературы, свидетельствующими о ряде преимуществ его детекции по сравнению с другими молекулярными маркерами, в частности, антигеном ядер пролиферирующих клеток (Proliferating Cells Nuclear Antigen, PCNA). Ki-67, во-первых, отражает наиболее важный параметр пролиферации – величину пролиферативного пула; во-вторых, экспрессируется практически во всех фазах клеточного цикла; и, в-третьих, обладает коротким периодом полужизни (60-90 мин.), в отличие, например, от 20 часов и более PCNA, что обеспечивает высокую селективность окрашивания экспрессирующих его клеток.

Результат иммуногистохимического выявления белка Ki-67 в парафиновых срезах костного мозга был представлен в виде специфического темно-коричневого окрашивания ядер миелокариоцитов и митотических фигур. В костном мозге людей, погибших от острой лучевой болезни спустя 2-4 недели (14-30-е сут.) после острого радиационного воздействия, выявлены низкие значения митотической активности (менее 5% клеток, ядра которых обнаруживали положительную иммуногистохимическую реакцию на Ki-67). В дальнейшем по ходу прогрессирования репаративных процессов, сопряженных с продолжительностью жизни пострадавших в результате аварийного облучения людей (четыре и более недель от начала заболевания, 32-96-е сут.), отмечали постепенное усиление пролиферативной активности клеток гемопозитической паренхимы костного мозга, достигавшей максимальных значений (до 27% Ki-67-меченых ядер) в период морфологически активного восстановления.

Был проведен сравнительный анализ показателей пролиферативной активности миелокариоцитов, диагностируемой в серийных гистологических срезах костного мозга при рутинной и иммуногистохимической методиках исследования. Показано, что у людей, погибавших от острой лучевой болезни на 32-96-е сут., т.е. при наличии в костном мозге морфологических признаков активного восстановления, количество митозов из расчета на стандартное поле зрения микроскопа, подсчитанное при оценке рутинно окрашенных препаратов, составляло в среднем  $14,9 \pm 9,4$  при общей численности клеток в стандартном поле зрения микроскопа равной  $481,2 \pm 123,8$  (митотический индекс 3%).

Полученные результаты свидетельствуют, таким образом, о том, что традиционный подход к оценке митотической активности костного мозга (подсчет в гистологических препаратах количества митотических фигур), обладая рядом достоинств, как относительно простой и быстрый метод, не требующий значительных финансовых затрат, не лишен в то же время недостатков. Так, он позволяет лишь ориентировочно оценивать долю клеток с видимыми при рутинной гистологической

окраске морфологическими признаками митоза, поскольку на его точность влияют временное соотношение фаз митотического цикла (чем короче продолжительность морфологически распознаваемых этапов митоза, тем меньше делящихся клеток видит исследователь в каждый момент времени; и, наоборот, удлинение времени митоза приводит к увеличению митотического индекса и кажущемуся усилению пролиферации), а также асинхронность вступления клеток в митоз.

### **Заключение**

Метод иммуноморфологической идентификации делящихся клеток, основанный на выявлении иммунофенотипических маркеров пролиферации (в настоящем исследовании – антигена Ki-67, экспрессируемого во всех фазах клеточного цикла G1, S и G2) обеспечивает высокую селективность окрашивания не только явных митотических фигур, но и «оккультных» при рутинном окрашивании ядер делящихся миелокариоцитов, что позволяет существенным образом уменьшить недооценку частоты митозов и, следовательно, в целом митотического режима костномозгового гемопоэза в период пострадиационного восстановления.

## ИЗУЧЕНИЕ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЭРИТРОЦИТОВ У ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИХ НЕПОСРЕДСТВЕННОМ КОНТАКТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

*И. Н. Когарко<sup>1</sup>, В. В. Петушкова<sup>1</sup>, Б. С. Когарко<sup>1</sup>, Е.А. Нейфах<sup>1</sup>, О.В. Киторова<sup>1</sup>,  
И.И. Ганеев<sup>1</sup>, Н.С. Кузьмина<sup>2</sup>, Е.И. Селиванова<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики  
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

<sup>3</sup>МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск  
e-mail: [vladapetushkova@yandex.ru](mailto:vladapetushkova@yandex.ru)

*Резюме.* В данной работе проводилось изучение эритроцитов с микроядрами, свидетельствующих об изменениях в структуре ДНК эритроцитов при воздействии ионизирующей радиации. Необлученные и облученные животные содержались совместно в одной клетке. Показано, что у облученных мышей отмечается статистически значимое снижение числа эритроцитов с микроядрами – радиационно-индуцированный «эффект спасения». У необлученных мышей - «свидетелей» показана тенденция к росту количества эритроцитов с микроядрами – радиационно-индуцированный «эффект свидетеля». Выявленные изменения эритроцитов у необлученных животных являются показателем нестабильности генома клеток и предполагают нарушение в структуре ДНК эритроцитов.

*Ключевые слова:* нестабильность генома, микроядерный тест, радиационно-индуцированный «эффект свидетеля», радиационно-индуцированный «эффект спасения»

## STUDY OF THE ERYTHROCYTE GENOME INSTABILITY IN IRRADIATED BY IONIZING RADIATION AND NON-IRRADIATED ANIMALS KEPT IN CONTACT

*I.N. Kogarko<sup>1</sup>, V.V. Petushkova<sup>1</sup>, B.S. Kogarko<sup>1</sup>, E.A. Neyfakh<sup>1</sup>, O.V. Kititorova<sup>1</sup>,  
I.I. Ganeev<sup>1</sup>, N.S. Kuzmina<sup>2</sup>, E.I. Selivanova<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow;

<sup>2</sup>Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow;

<sup>3</sup>A. Tsyb MRRC, Obninsk

e-mail: [vladapetushkova@yandex.ru](mailto:vladapetushkova@yandex.ru)

*Summary.* Mice peripheral blood erythrocytes with micronucleus were studied, indicating changes in the structure of erythrocyte DNA under the influence of ionizing radiation. Irradiated and unirradiated animals were kept together in the same cage. It was shown that in irradiated mice there is a statistically significant decrease in the number of erythrocytes with micronucleus – a radiation-induced "rescue effect". In unirradiated bystander mice, a tendency to increase erythrocytes with micronucleus was shown - a radiation-induced "bystander effect". The revealed changes in erythrocytes in unirradiated animals are an indicator of the instability of the cell genome and suggest a violation in the structure of erythrocyte DNA.

*Keywords:* genome instability, micronucleus test, radiation-induced "bystander effect", radiation-induced "rescue effect"

Воздействие ионизирующего излучения на разного рода клетки приводит к различным повреждениям, мутациям и даже гибели. Одним из проявлений данного

воздействия является радиационно-индуцированная нестабильность генома, которая проявляется в нарушении структуры ДНК, в мутации генов, возникновении микроядер, увеличении частоты хромосомных aberrаций. В данной работе была поставлена задача изучения радиационных «эффектов свидетеля» на уровне организма [1]. Проводилось исследование методом анализа микроядер [2] различных проявлений изменений в эритроцитах необлученных мышей, которые находились в непосредственном контакте с облученными животными.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованы 60 беспородных мышей-самок, которые были распределены по 4 клеткам, в каждой из которых находились мыши облученной и необлученной групп. В двух из четырех клеток мыши были разделены металлической сеткой, в двух других могли беспрепятственно контактировать друг с другом. В двух отдельных клетках содержались облученный контроль и интактный контроль. Мыши были облучены в дозе 3 Гр на исследовательской гамма-установке радиобиологической ИГУР-1М с 4 источниками  $^{137}\text{Cs}$ . В исследованиях оценивали частоту полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами, нормальных хромотофильных (оксифильных) (НХЭ) эритроцитов с микроядрами, суммарного количества эритроцитов в периферической крови у мышей через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 сутки после начала эксперимента. Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Различия принимали статистически значимыми при вероятности 0-гипотезы  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

У облученных животных было выявлено статистически значимое снижение частоты НХЭ с микроядрами при сравнении с гамма-контролем ( $t_2$ : 1) на 3-и сутки после начала эксперимента при содержании в одной клетке без перегородки ( $t_2 = 2,35$ ;  $p = 0,03$ ) 2) на 14-е сутки как в группе, где животных содержали без перегородки ( $t_2 = 6,03$ ;  $p = 0,000011$ , так и в группе с перегородкой ( $t_2 = 3,29$ ;  $p = 0,004$ ); 3) на 60-е сутки в группе, где животных содержали без перегородки ( $t_2 = 2,8$ ;  $p = 0,01$ ). У необлученных мышей-«свидетелей», содержащихся с облученными мышами в клетке с перегородкой, на 14-е сутки выявлена тенденция к превышению частоты микроядерных эритроцитов показателей в биоконтроле ( $t_1 = 1,79$ ;  $p = 0,09$ ). На 60-е сутки у необлученных мышей-«свидетелей», содержащихся с облученными мышами в клетке без перегородки, также выявлена тенденция к превышению частоты микроядерных эритроцитов показателей в биоконтроле ( $t_1 = 1,39$ ;  $p = 0,18$ ). На основании полученных в настоящем эксперименте данных, делается предположение, что радиационный «эффект свидетеля» имеет обратный характер, то есть необлученные организмы способны снижать радиационные эффекты у облученных особей. Аналогичные результаты получены в другой работе авторов [3].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, полученные данные свидетельствуют о нестабильности генома эритроцитов при действии ионизирующего излучения, которые предполагают наличие изменений по ДНК- сигнальному пути, состоящему из следующих этапов: облучение – первичный окислительный стресс – модификация ДНК – апоптоз поврежденных клеток – свободная модифицированная внеклеточная ДНК – прием сигнала необлученными клетками – вторичный окислительный стресс – модификация ДНК [4].

#### Литература

1. Mothersill C., Smith R., Wang J., Rusin A., Fernandez-Palomo C., Fazzari J., Seymour C. Biological Entanglement-Like Effect After Communication of Fish Prior to X-Ray Exposure // Dose Response. 2018. Feb 15.16(1):1559325817750067. eCollection Jan-Mar 2018. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29479295/> (Дата обращения 08.07.2022)



2. Hayashi M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test // *Genes. Environ.* 2016. 38:18; eCollection 2016
3. Когарко И. Н., Петушкова В. В., Когарко Б. С., Пряхин Е. А., Нейфах Е.А., Ктиторова О.В., Андреев С. С., Ганеев И.И., Кузьмина Н.С., Селиванова Е.И., Пелевина И.И. Исследование действия ионизирующего излучения на радиационно-индуцируемые изменения клеток системы крови мышей на уровне организма // *Радиация и риск, Sorus, Q3 2023. Т. 32, № 1. С. 48-60. DOI: 10.21870/0131-3878-2023-32-1-48-60*
4. Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Вейко Н.Н. ДНК-сигнальный путь, обеспечивающий развитие радиационного эффекта свидетеля в клетках человека // *Радиационная биология. Радиоэкология. 2011.Т. 51, No 6, С. 651.*

## **ЦИТОМНЫЙ АНАЛИЗ НАЗАЛЬНЫХ И БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ОСМОТРЕ РАЗНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ**

*М.Ф.Коняшкина<sup>1</sup>, Е.К.Кривцова<sup>1</sup>, А.Г.Кедрова<sup>2</sup>, Г.В.Кравченко<sup>2</sup>, Т.А.Греян<sup>2</sup>, Ю.С.Константинова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России

<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России

[MKonyashkina@cspmz.ru](mailto:MKonyashkina@cspmz.ru)

*Резюме.* Проведен цитомный анализ назальных эпителиоцитов 46 мужчин 35 - 62 лет. Средние значения цитогенетических и цитостатических показателей согласуются со средне популяционными, установленными ранее как другими авторами, так и в собственных исследованиях. Выявлены достоверные корреляционные взаимосвязи частот генотоксических и цитотоксических эффектов эпителиоцитов с данными клинического анализа крови. Высказано предложение учитывать новый показатель «выброс хроматина ядра в назальных эпителиоцитах» в качестве маркера показателей воспаления у человека при профилактических осмотрах.

*Ключевые слова:* назальные эпителиоциты, цитомный анализ, показатели эффектов нестабильности генома, микроядра, конденсация хроматина, лизис, пикноз, карирексис, апоптоз.

## **CYTOMIC ANALYSIS OF NASAL AND BUCCAL EPITHELIAL CELLS IN PREVENTIVE EXAMINATION OF DIFFERENT POPULATION GROUPS**

*M.F.Konyashkina<sup>1</sup>, E.K.Krivtsova<sup>1</sup>, A.G.Kedrova<sup>2</sup>, G.V.Kravchenko<sup>2</sup>, T.A.Greyan<sup>2</sup>, Yu.S.Konstantinova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks" of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Service for Surveillance in Healthcare The Ministry of Public Health and Social Development Government of the Russian Federation of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

e-mail: [MKonyashkina@cspmz.ru](mailto:MKonyashkina@cspmz.ru)

*Summary.* Cytomic analysis of nasal epithelial cells of 46 men aged 35-62 years was carried out. The average values of cytogenetic and cytostatic indicators are consistent with the average population values established earlier both by other authors and in their own studies. Significant correlations of the frequencies of genotoxic and cytotoxic effects of epithelial cells with the data of clinical blood analysis were revealed. A proposal was made to take into account the new indicator "release of chromatin of the nucleus in nasal epithelial cells" as a marker of inflammation in humans during preventive examinations.

*Keywords:* nasal epithelial cells, cytomic analysis, indicators of genome instability effects, micronuclei, chromatin condensation, lysis, pyknosis, caryrexix, apoptosis.

Цитомный анализ - расширенное цитогенетическое исследование с учетом всех возможных ядерных аномалий и показателей, характеризующих процессы пролиферации и гибели клеток. Анализ буккальных и назальных эпителиоцитов позволяет оценить генотоксическое действие средовых компонент атмосферного воздуха и эффекты ингаляционного воздействия профессиональных факторов [1-3]. Целью исследования являлась оценка эффективности для профилактических обследований неинвазивного метода цитомного анализа эксфолиативных клеток.

Проведен цитомный анализ назальных и буккальных эпителиоцитов 46 практически здоровых мужчин 35 - 62 лет, обратившихся с просьбой о прохождении профилактического осмотра. В клетках назального эпителия, кроме известных, учитывали новый показатель – «выброс хроматина за пределы ядра» (ВХ), морфологически представленного тяжами хроматина выступающих из ядра, и, в отличие от ядерной протрузии, могут отсутствовать фрагменты ядерной мембраны.

Результаты цитомного анализа клеток двух тканей показали, что обнаруженные уровни нестабильности генома согласуются с значениями, описанными в литературе [1,5,6] и определенными ранее в собственных исследованиях [2-4]. Средняя частота ВХ составила  $22,49 \pm 3,82\%$ . Корреляционный анализ между массивами показателей назального и буккального эпителиев выявил достоверные ассоциативные связи между частотами клеток с ВХ и следующими показателями нестабильности генома в щеке: полиядерными буккальными эпителиоцитами ( $R=0,34$  - здесь и далее  $P \leq 0,05$ ) и клетками с кариопикнозом ( $R=0,31$ ). При графическом отображении ассоциации, выделяется группа людей с высокими значениями частот клеток с ВХ. У этой группы людей частота клеток с ВХ коррелировала с уровнями индикаторов воспаления в анализе крови: повышением содержания лейкоцитов ( $R=0,88$ ) и СОЭ ( $R=0,88$ ), а также с количеством эритроцитов ( $R=-0,83$ ), объемом эритроцита ( $R=-0,84$ ), гематокритом ( $R=-0,94$ ) и индексом массы тела обследуемых (ИМТ,  $R=0,88$ ). При анализе всего массива найдены ассоциации частоты клеток с ВХ с количеством эритроцитов ( $R=-0,40$ ) и гематокритом ( $R=-0,39$ ) но ассоциации с маркерами воспаления (содержанием лейкоцитов и уровнем СОЭ), а также с ИМТ выявлены не были. В то же время, ассоциированные с ВХ показатели цитомного анализа щеки – частоты полиядерных клеток и клеток с пикнозом ядра, не коррелировали с показателями анализа крови.

С использованием всего массива данных выявлена корреляционная связь между частотой двуядерных назоцитов (характеризующих блок цитотомии) с повышением ИМТ ( $R=0,30$ ) и количества эритроцитов ( $R=-0,46$ ). Частоты назальных эпителиоцитов с конденсированными ядрами ассоциированы с повышением лейкоцитов ( $R=0,45$ ) и нейтрофилов ( $R=0,48$ ) в анализе крови. Частота назоцитов с перинуклеарной вакуолью взаимосвязана с анизоцитозом эритроцитов ( $R=0,37$ ) и количеством лимфоцитов ( $R=-0,42$ ). Частота назоцитов с пикнозом ядра коррелировала с процентом тромбоцита ( $R=0,43$ ). Грибковая обсемененность слизистой носа (которую не изучали в цитомном анализе слизистой оболочки щеки) коррелировала с рядом показателей анализа крови: средним объемом тромбоцитов ( $R=0,41$ ), долей (%) базофилов ( $R=-0,38$ ), СОЭ ( $R=0,53$ ) и общего холестерина ( $R=0,32$ ).

На всем массиве буккального эпителия общим с назальным показано взаимодействие маркера апоптоза - частоты клеток с конденсированными ядрами, с показателями крови (другими по спектру): концентрация гемоглобина ( $R=-0,39$ ), анизоцитоз эритроцитов ( $R=-0,46$ ) и абсолютное количество базофилов ( $R=-0,36$ ). Найдены взаимосвязи двух показателей клеточной гибели в щеке с кровью отличающиеся от таковых в носу: частота клеток с кариорексисом коррелировала с средним объемом эритроцита ( $R=0,38$ ), абсолютным количеством нейтрофилов ( $R=0,39$ ), долей (%) базофилов ( $R=0,51$ ), лимфоцитов ( $R=0,38$ ) и концентрацией гемоглобина ( $R=-0,38$ ); а также частота клеток с лизисом ядра была ассоциирована со снижением уровня лейкоцитов ( $R=-0,47$ ). Как в щеке, так и в носу была найдена взаимосвязь показателей цитомного анализа с анизоцитозом эритроцитов - достаточно серьезным отклонением в крови (в буккальном эпителии коррелировала частота клеток с микроядрами ( $R=0,40$ ) – генетические повреждения, в назальном, как упоминалось выше, - показатель клеточной гибели).

Таким образом, анализ связей между эффектами нестабильности генома в назальном и буккальном эпителиях одних и тех же людей и данными клинических исследований неожиданно выявил качественные различия в реакциях двух тканей на средовые воздействия. Учитывая высокую связь повышения частоты ВХ с маркерами воспаления, а еще и ИМТ, связь которого с воспалением последнее время отмечается разными авторами [7], можно сделать вывод о диагностической ценности нового показателя - ВХ.

Другие авторы отмечали связь уровней показателей цитомного анализа (лимфоцитов крови и буккальных эпителиоцитов) с некоторыми биохимическими параметрами крови [8,9], а в нашем исследовании впервые определены взаимосвязи с показателями клинического анализа крови. Кроме того, в данной работе впервые представлен новый показатель ВХ назоцитов и продемонстрирована его связь с воспалением, что позволяет предложить его учет в профилактических обследованиях. Поскольку частота клеток с ВХ варьирует в широком диапазоне значений, а индикатором негативных состояний является его высокий уровень, увеличение ВХ можно отследить при анализе относительно малого количестве клеток (100-300). При обнаружении повышенной частоты клеток с ВХ (более 4%) можно рекомендовать носителю эффекта проведение углубленного обследования.

#### **Литература**

1. Tolbert E, Shy C.M, Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users get access arrow. *American Journal of Epidemiology*, Volume 134, Issue 8, 15 October 1991, Pages 840–850, [https](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113441)
2. Коваленко М. А. Сычева Л.П. Микроядерный тест на клетках назального эпителия В кн. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. под ред. академика РАМН, д.м.н., проф. Ю.А. Рахманина, д.б.н. Л.П.Сычевой. – М.: Гениус, 2007: 268-276
3. Юрченко В.В., Подольная М.А, Ингель Ф.И., Кривцова Е.К., Беляева Н.Н., Недачин А.Е., Рязова Ю.А., Рахманин Ю.А. Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах. под ред. академика РАМН, д.м.н., проф. Ю.А. Рахманина, д.б.н. Л.П.Сычевой. – М.: Гениус, 2007: 268-276
4. Sycheva L.P., Umnova N.V., Kovalenko M.A, Zhurkov V.S., Shelepchikov A.A., Roumak V.S. Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of agent Orange application in Vietnam. *Chemosphere*. 2016 Feb;144:1415-20.
5. Moore L.E., N Titenko-Holland, P J Quintana, M T J *Toxicol Environ Health*. 1993 Oct-Nov;40(2-3):349-57.
6. Mergener M, Rhoden CR, Amantéa SL. Nuclear abnormalities in cells from nasal epithelium: a promising assay to evaluate DNA damage related to air pollution in infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2014 Nov-Dec;90(6):632-6.
7. Matone A., O'Grada C.M., Dillon E.T., Morris C., Ryan M.F., Walsh M., R Gibney E., Brennan L., Michael J Gibney M.J., Morine M.J., Roche H.M. Body mass index mediates inflammatory response to acute dietary challenges. / *Mol Nutr Food Res*. 2015 Nov;59(11):2279-92.
8. Bull, C. F., Mayrhofer, G., Zeegers, D., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Fenech, M. F.. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2012. 53(4), 311–323.
9. Titenko-Holland, N., Jacob, R. A., Shang, N., Balaraman, A., & Smith, M. T. (1998). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998. 417(2-3), 101–114.

## ЛАКТОФЕРРИН СНИЖАЕТ НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

*М.Ю. Копеева<sup>1</sup>, А.Б. Черепов<sup>1,2</sup>, И.Ю. Зарайская<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», Москва, Россия

e-mail: m.kopaeva@mail.ru

*Резюме.* Изучали влияние человеческого лактоферрина (Лф) на клетки зубчатой извилины гиппокампа мозга 2-2,5-месячных самцов мышей линии C57BL/6 после острого гамма-облучения головы (8 Гр). Появление TUNEL<sup>+</sup>-клеток в субгранулярной зоне через 6 ч после воздействия сопровождалось значительным снижением числа Ki-67- и DCX-иммунореактивных клеток. Введение Лф облученным животным позволило уменьшить на 77% количество TUNEL<sup>+</sup>-клеток, увеличить количество сохранившихся пролиферирующих клеток и незрелых нейронов.

*Ключевые слова:* человеческий лактоферрин, острое гамма-облучение головы, зубчатая извилина гиппокампа, ДНК, клеточная пролиферация, TUNEL

## LACTOFERRIN REDUCES THE NEGATIVE EFFECTS OF RADIATION DAMAGE IN THE BRAIN

*Kopaeva M.Yu.<sup>1</sup>, Cherepov A.B.<sup>1,2</sup>, Zarayskaya I.Yu.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Normal Physiology Named after P.K. Anokhin, Moscow, Russia

e-mail: m.kopaeva@mail.ru

*Summary.* We studied the effects of human lactoferrin (Lf) on the cells of the hippocampal dentate gyrus of young adult male C57BL/6 mice after acute gamma irradiation of the head (7.5 Gy). The appearance of TUNEL<sup>+</sup>-cells in the subgranular zone 6 hours after irradiation was accompanied by a decrease in the number of Ki-67- and DCX-immunoreactive cells. Administration of Lf to irradiated animals allowed to reduce the number of TUNEL<sup>+</sup>-cells (by 77%), increase the number of surviving proliferating cells and immature neurons.

*Key words:* human lactoferrin, acute gamma irradiation of the head, dentate gyrus of the hippocampus, DNA, cellular proliferation, TUNEL

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения первичных и метастатических опухолей головного мозга. Однако существуют ограничения, связанные с толерантностью здоровых тканей, окружающих опухоль, в которых облучение может вызвать тяжелые повреждения. У пациентов могут развиваться побочные эффекты, сопровождающиеся неврологическими осложнениями, такими как временный дефицит мозговой деятельности или даже прогрессирующая, необратимая когнитивная дисфункция.

Облучение повреждает ДНК клеток и, следовательно, нарушает синтез белка. Побочные эффекты ионизирующего излучения на различные метаболические пути проявляются уже через несколько часов после воздействия [1]. В связи с этим, является актуальным поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для

профилактики и ранней патогенетической терапии радиационных поражений. Особый интерес представляют молекулы эндогенного происхождения, участвующие в регуляции физиологических процессов в организме.

Лактоферрин — полифункциональный глобулярный гликопротеин из семейства трансферринов — является перспективным для изучения в качестве средства ранней противолучевой терапии. Этот белок обладает множественными защитными функциями, в частности, радиопротективными и нейропротективными свойствами [2], он способен модулировать целый спектр нейрональных процессов посредством изменения экспрессии генов, среди продуктов которых присутствуют регуляторные и эффекторные белки [3, 4].

Целью настоящей работы стало исследование влияния человеческого лактоферрина (Лф) на клетки зубчатой извилины гиппокампа мозга мыши после острого гамма-облучения головы.

**Материалы и методы.** Исследование было проведено на 2-2,5-месячных самцах мышей линии C57BL/6. В работе был использован Лф, выделенный из женского молозива. Мыши были разделены на три группы: две экспериментальные («Обл», «Обл+Лф») и контрольную (активный контроль, «АК»). Облучение головы животных проводили на установке ГУТ-200М от источника  $^{60}\text{Co}$  в дозе 8,0 Гр при мощности дозы 2,35 Гр/мин. Для этого каждую мышь иммобилизовали с помощью фиксирующего устройства, тело экранировали свинцовой защитой. Сразу после воздействия животные группы «Обл+Лф» получили инъекцию Лф (4 мг/животное). Через 6 ч после облучения мышей анестезировали, транскардиально перфузировали, извлекали головной мозг.

Выявление фрагментации ДНК проводили с помощью набора *In situ* BrdU-Red DNA fragmentation (TUNEL); иммунофлуоресцентное окрашивание — с использованием первичных антител к белкам Кдi-67, Doublecortin (DCX), NeuN и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647. Ядра клеток докрасивали Hoechst 33342. Окрашенные срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV10i. Был проведен количественный анализ TUNEL — позитивных, Ki-67 — позитивных и DCX — позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа.

**Результаты и обсуждение.** Двунитевые разрывы ДНК являются основным триггером, определяющим дальнейшую судьбу клетки, так как от их числа и эффективности процессов репарации зависит ответ клетки на действие ионизирующего излучения. TUNEL-позитивные клетки почти полностью отсутствовали в зубчатой извилине гиппокампа необлученных мышей. Однократное облучение головы вызвало увеличение количества TUNEL<sup>+</sup>-клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа животных («Обл»  $26,0 \pm 1,7$  vs «АК»  $0,5 \pm 0,1$ ;  $p = 0,015$ ) через 6 ч после воздействия. TUNEL<sup>+</sup>-клетки располагались одиночно или группами. Наблюдали морфологически измененные пикнотические ядра. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. Однократное облучение головного мозга дозами от 2 до 15 Гр приводило к резкому увеличению уровня апоптоза в зубчатой извилине гиппокампа молодых взрослых крыс и мышей, наблюдаемого через три – восемь часов [1]. Введение Лф облученным животным («Обл+Лф») значительно уменьшило количество TUNEL<sup>+</sup>-клеток ( $6,0 \pm 0,3$ ;  $p = 0,050$  по сравнению с «Обл»).

Субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа является областью активной клеточной пролиферации у молодых взрослых мышей. Пролиферирующие клетки были помечены антителом против Ki-67, ядерного антигена, который экспрессируется на всех стадиях клеточного цикла, кроме G<sub>0</sub>. Незрелые нейроны были идентифицированы с помощью антитела против DCX, белка связанного с миграцией нейронов и нейробластов. Анализ окрашенных срезов показал, что у контрольных животных Ki-67- позитивные клетки часто образовывали скопления в субгранулярной

зоне. Как и ожидалось, Ki-67<sup>+</sup>-клетки не экспрессировали маркер зрелых нейронов NeuN. Наблюдали большое количество DCX<sup>+</sup>-клеток в зубчатой извилине гиппокампа этих животных. Облучение привело к резкому снижению количества Ki-67<sup>+</sup>- («Обл» 2,6 ± 0,7 vs «АК» 16,0 ± 0,6; p = 0,008) и DCX<sup>+</sup>-клеток («Обл» 8,0 ± 0,7 vs «АК» 59,2 ± 4,8; p = 0,022) в группе «Обл» через 6 ч после воздействия. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. Ранее было показано, что рентгеновское облучение головы в дозе 10 Гр вызывало уменьшение числа как Ki-67<sup>+</sup>, так и DCX<sup>+</sup>-клеток в зубчатой извилине гиппокампа крыс и мышей (до 10% от контроля), наблюдаемое через 5 ч, 12 ч или 3 месяца [1]. Введение Лф облученным животным позволило значимо увеличить количество Ki-67<sup>+</sup>- и DCX<sup>+</sup>-клеток (9,8 ± 1,5; p = 0,029 и 12,9 ± 0,6; p = 0,050, соответственно, по сравнению с группой «Обл»).

Таким образом, появление TUNEL-положительных клеток в субгранулярной зоне через 6 ч после облучения сопровождалось соответствующим снижением количества Ki-67- и DCX-иммунореактивных клеток. Введение Лф оказало защитное действие на клетки мозга мыши при остром гамма-облучении головы, которое проявлялось в уменьшении количества TUNEL<sup>+</sup>-клеток (на 77% относительно группы «Обл»), увеличении количества пролиферирующих клеток (с 16% до 61% относительно контрольных животных) и количества незрелых нейронов (с 14% до 22% относительно контрольных животных) в зубчатой извилине гиппокампа. Эти данные получены нами впервые.

Механизм действия Лф в этой экспериментальной модели, по-видимому, связан с прерыванием одного или сразу нескольких звеньев патогенеза радиационного поражения: активации реакций свободнорадикального окисления, воспаления, нарушения регуляции репарации ДНК, апоптоза [2]. Известно, что Лф может снижать экспрессию провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкинов - 1 и -6), уменьшать образование АФК, регулировать экспрессию белков, участвующих в деградации липидов, контролируя активность сигнального пути цАМФ/ERK, повышать уровни мРНК и белка нейротрофического фактора мозга (BDNF) и компонентов его сигнального пути в гиппокампе [3]. Мы изучали острые эффекты и не определяли долгосрочные последствия введения Лф на фоне однократного облучения головы мышей. Необходимы дальнейшие исследования для обоснования выдвинутых гипотез.

**Выводы.** Полученные результаты позволяют предположить, что Лф может снижать негативные последствия радиационного повреждения в мозге. Они свидетельствуют о перспективности разработки на основе Лф радиопротекторных препаратов для профилактики и лечения осложнений при профессиональном облучении, для снижения побочных эффектов лучевой терапии.

#### Список литературы

1. *Balentova S., Adamkov M.* Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: a review // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 11. – P. 27796-27815.
2. *Kopaeva M.Yu., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Demorzhii M.S., Nesterenko M.V., Zarayskaya I.Yu., Karganov M.Yu.* New properties of a well-known antioxidant: pleiotropic effects of human lactoferrin in mice exposed to gamma irradiation in a sublethal dose // *Antioxidants.* – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1833.
3. *Chen Y., Zheng Z., Zhu X., Shi Y., Tian D., Zhao F., Liu N., Hüppi P.S., Troy F.A., Wang B.* Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation // *Mol Neurobiol.* – 2015. – Vol. 52, № 1. – P. 256-269.
4. *Kopaeva M.Yu., Azieva A.M., Cherepov A.B., Zarayskaya I.Yu.* Lactoferrin modulates induction of transcription factor c-Fos in neuronal cultures // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 9. – P. 8373.

## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОТОНАМИ И ПЛОТНОИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ**

*Е. В. Корякина, М. В. Трошина, В. И. Потетня, С. Н. Корякин,  
В. О. Сабуров, А. Н. Соловьев, А. А. Лычагин*

Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ  
«НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия  
e-mail: [ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru](mailto:ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru)

*Резюме.* Исследована эффективность последовательного облучения протонами (95-105 МэВ) в сочетании с быстрыми нейтронами (14,5 МэВ), ионами углерода (400 МэВ/н) и тяжелыми ядрами отдачи, образуемыми быстрыми нейтронами в условиях отсутствия равновесия вторичных заряженных частиц. Показана зависимость гибели опухолевых клеток (В14-150, фибросаркома) от последовательности облучения, времени между воздействиями и соотношения дозовых вкладов в суммарную дозу для каждой схемы облучения.

*Ключевые слова:* комбинированное (сочетанное) облучение, выживаемость опухолевых клеток, протоны, нейтроны, ионы углерода

## **LETHAL DAMAGE FORMATION IN TUMOR MAMMALIAN CELLS FOLLOWING COMBINED EXPOSURE TO PROTONS AND HIGH LET RADIATIONS**

*E. V. Koryakina, M. V. Troshina, V. I. Potetnya, S. N. Koryakin,  
V. O. Saburov, A. N. Solovov, A. A. Lychagin*

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia  
e-mail: [ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru](mailto:ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru)

*Summary.* The efficiency of sequential irradiation with protons (95-105 MeV) in combination with fast neutrons (14.5 MeV), or carbon ions (400 MeV/n), or heavy recoils formed by fast neutrons in the absence of secondary charged particles equilibrium is investigated. The dependence of tumor cell death (B14-150, fibrosarcoma) on the sequence of irradiation, the time between exposures and the dose contributions to the total dose is shown for each irradiation scheme.

*Key words:* combined irradiation, tumor cells survival, protons, neutrons, carbon ions

Исследование закономерностей формирования эффектов смешанного воздействия ионизирующих частиц различными ЛПЭ на биологические объекты является актуальным как в фундаментальном смысле, так и в связи с освоением космоса и с увеличивающимся применением ускоренных частиц в лучевой терапии онкологических больных. При этом нужно учитывать, что на эффективность комбинированного (сочетанного) облучения будет влиять целый ряд факторов, в том числе соотношение вкладов излучений с высокой и низкой ЛПЭ, спектр вторичных частиц, образующихся по мере прохождения пучков нейтронов или ионов в биологической ткани, взаимодействие повреждений, индуцируемых первичными и вторичными частицами, а в клинической практике – последовательность воздействий, фракционирование дозы, интервал между облучениями и т.п.

Цель работы состояла в сравнительном исследовании различных схем облучения опухолевых клеток протонами и быстрыми нейтронами, как в условиях



равновесия вторичных заряженных частиц, так и в его отсутствии, а также протонами и ускоренными ионами углерода. Эксперименты проводили на клетках китайского хомячка линии В14-150 (фибросаркома) в стационарной фазе роста культуры. Эффективность сочетанного воздействия оценивали по выживаемости клеток (метод макроколоний).

Облучение протонами выполняли на отечественном Комплексе протонной терапии «Прометеус» (АО «ПРОТОМ»), быстрыми нейтронами со средней энергией 14,5 МэВ и тяжелыми ядрами отдачи (ТЯО), образуемыми ими в неравновесных условиях – на портативном нейтронном генераторе НГ-24 (ФГУП ВНИИА им. Н. Л. Духова ГК «Росатом»), ионами углерода – на радиобиологическом стенде ускорителя У-70 в Центре коллективного пользования ИФВЭ им. А. А. Логунова. При облучении протонами (95–105 МэВ) и ионами углерода (400 МэВ/н) биологические объекты размещали в центре расширенного пика Брэгга (до 15 мм для протонов и до 30 мм – для ионов углерода). Для получения ТЯО монослой клеток облучали нейтронами через стеклянную подложку флакона Карреля (1 мм), создавая таким образом условия отсутствия протонного равновесия, при которых более 80 % дозы обусловлено вкладом ядер С, N, O и  $\alpha$ -частицами.

Изучали следующие схемы сочетанного облучения: протоны → нейтроны, протоны → ионы углерода и протоны → ТЯО, а также обратные последовательности воздействия. Среднедозовая ЛПЭ протонов в расширенном пике Брэгга составляла ~3 кэВ/мкм, ионов углерода ~55 кэВ/мкм, нейтронов с энергией 14,5 МэВ ~100 кэВ/мкм, ТЯО ~460 кэВ/мкм. Исследования проводили с различными интервалами между облучениями от 0 до 8 ч, для протонно-углеродного облучения – от 0 до 4 ч. Суммарная доза с учетом ОБЭ действующих излучений достигала 7–9 Гр(ОБЭ) при вкладах частиц с высокими ЛПЭ ~20–45 %.

При последовательном облучении протонами и ТЯО все изученные схемы статистически значимо различались между собой ( $p < 0,05$ , Т-критерий Крамера-Уэлча [1]) при интервалах между облучениями более 1 ч. Коэффициент эффективности комбинированного действия излучений разного качества (К), рассчитанный по формуле для выживаемости клеток [2], для последовательности ТЯО → протоны с вкладом ТЯО 40 % в суммарную дозу значимо не отличался от 1 ( $1,02 \pm 0,02$ ), т. е. проявлялось независимое действие излучений. Для обратной последовательности, а также при вкладе ТЯО 20 % в суммарную дозу получены  $K > 1$  ( $1,2–1,3$ ), что говорит об антагонистическом эффекте.

В случае протонно-углеродного облучения опухолевых клеток наблюдался синергизм ( $K = 0,65 \pm 0,072$ ) при действии ионов углерода первой фракцией с вкладом в суммарную дозу 45 %. При снижении вклада до 30 % проявлялось независимое действие двух типов излучений –  $K = 0,91 \pm 0,055$ . При последовательности протоны → ионы углерода эффект можно классифицировать как антагонистический:  $K = 1,06 \pm 0,069$  и  $K = 1,33 \pm 0,157$  для вкладов ионов углерода 45 % и 30 % соответственно.

В исследованиях с комбинированным облучением протонами и нейтронами установлен синергетический эффект для всех изученных схем воздействия, коэффициенты  $K < 1$  ( $0,6–0,7$ ). При этом наиболее выраженным он был для последовательности нейтроны → протоны при вкладе нейтронов в суммарную дозу 40 % ( $K = 0,57 \pm 0,011$ ). Однако статистически значимых различий между схемами протонно-нейтронного облучения не выявлено.

Следует отметить две особенности проведенных экспериментов. Во-первых, в роли излучения с низкой ЛПЭ были использованы протоны в пике Брэгга (ЛПЭ  $\approx 2–5$  кэВ/мкм) вместо стандартных рентгеновского или  $^{60}\text{Co}$ . Во-вторых, комбинированное

воздействие излучений проводили по схеме фракционированного облучения, а не последовательного с первой фиксированной дозой одного из излучений.

Полученные результаты в целом согласуются с закономерностями, установленными в радиобиологических исследованиях эффектов комбинированного облучения клеток млекопитающих разными видами излучения. Их интерпретация основана на представлениях об определяющей роли двойных разрывов (ДР) ДНК в формировании летальных клеточных повреждений. Это могут быть, с одной стороны, нерепарируемые или нерепарированные до митоза ДР, формирующие парные фрагменты хромосом (концевые делеции). С другой стороны, летальные повреждения в виде асимметричных aberrаций хромосом (дигентрики, центрические и ацентрические кольца) образуются в результате ошибочной репарации пары ДР посредством известных механизмов клеточной репарации (NHEJ, HR, SSA). Количество и качество ДР ДНК (простые, сложные, с «чистыми» или «липкими» концами, в виде кластеров и т. п.) зависит от ЛПЭ излучения, его дозы, а при комбинированном облучении – и от соотношения доз. В случае углеродного и нейтронного пучков важным фактором является спектральный состав излучения, включающий как редко-, так и плотноионизирующий компоненты. При комбинированном фракционированном облучении интервал времени между подведением доз, их величина и последовательность определяют, в какой степени ДР, индуцированные двумя излучениями смогут провзаимодействовать в ходе их репарации. Баланс индуцирования ДР ДНК разной степени сложности и их репарации определяет наблюдаемый конечный результат комбинированного облучения.

Таким образом, результаты исследований указывают на большой биологический эффект для схем комбинированного воздействия, когда первым на опухолевые клетки действовало излучение с высокой ЛПЭ, что в разной степени было характерно для всех вариантов облучения. Также общей закономерностью являлось увеличение эффективности комбинированного воздействия с повышением вклада нейтронов, ТЯО и ионов углерода в суммарную дозу до 40–45 %, что обусловлено характером индуцируемых в клетках повреждений и их взаимодействием.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (соглашение от 05.10.2021 г. № 075-15-2021-1347).

1. Орлов, А. И. Проверка статистической гипотезы однородности математических ожиданий двух независимых выборок: критерий Крамера-Уэлча вместо критерия Стьюдента [Текст] // Политем. сет. электрон. науч. журн. Кубан. гос. аграр. универ. – 2015. – № 110. – С. 197-218.
2. Обатуров, Г. М. Комбинированное действие излучения разного качества [Текст] / Г. М. Обатуров, В. И. Потетия // Атомная энергия. – 1998. – Т. 84, № 1. – С. 42-50.
3. Friedland, W. Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC [Text] / W. Friedland, M. Dingfelder, P. Kundra, and P. Jacob // Mutat. Res. – 2011. – V. 711. – P. 28-40.
4. Belov, O. V. A quantitative model of the major pathways for radiation-induced DNA double-strand break repair [Text] / O. V. Belov, E. A. Krasavin, M. S. Lyashko, M. Batmunkh, N. H. Sweilam // Journal of Theoretical Biology. – 2015. – V. 366. – P. 115-130.

## СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ И HPRT-МУТАГЕНЕЗ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

*И.В. Кошлань*<sup>1,2</sup>, *Н.А. Кошлань*<sup>1</sup>, *П.Блага*<sup>1</sup>, *Ю.В. Мельникова*<sup>1</sup>, *Д.В. Петрова*<sup>1</sup>,  
*Р.Д.Говорун*, *И.В. Смирнова*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>2</sup>Государственный университет «Дубна», Дубна,

[koshlan@jinr.ru](mailto:koshlan@jinr.ru)

*Резюме.* В экспериментах, проведенных на клетках китайского хомячка линии V79, исследовано мутагенное действие тяжелых заряженных частиц. Проанализированы HPRT-мутация, хромосомные аберрации и структурные нарушения гена у спонтанных и облученных клеток на протяжении длительного времени экспрессии (до 45 суток) после воздействия излучений с разными физическими характеристиками. Максимальный выход мутантных клонов наблюдался в разные времена экспрессии в зависимости от характеристик ионизирующего излучения. В тестируемом интервале ЛПЭ излучений положение максимального выхода мутантной фракции смещалось в сторону увеличения времени экспрессии при более высоких ЛПЭ. В отдаленные сроки после облучения уровень мутагенеза снижался ниже спонтанного уровня. Хромосомные аберрации на протяжении всего срока исследования (до 45 суток) постепенно восстанавливались до контрольного уровня. У радиационно-индуцированных ионами <sup>11</sup>B мутантов наблюдалось увеличение доли делеционных мутантов с ростом дозы облучения (до ~70 %). У спонтанных мутантов делеционные образцы составляли не более 10 % от общего количества исследованных образцов.

*Ключевые слова:* V79, HPRT-мутация, облучение, ускоренные тяжелые ионы, геномная нестабильность, ЛПЭ, хромосомные аберрации

## STRUCTURAL DISORDERS AND HPRT-MUTAGENESIS AFTER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION WITH DIFFERENT PHYSICAL CHARACTERISTICS

*I.V. Koshlan*<sup>1,2</sup>, *N.A. Koshlan*<sup>1</sup>, *P. Bláha*<sup>1</sup>, *J.V. Melnikova*<sup>1</sup>, *D.V. Petrova*<sup>1</sup>,  
*R.D.Govorun*, *I.V. Smirnova*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow Region, Russia

<sup>2</sup>Dubna State University, Dubna, Moscow Region, Russia

e-mail: [koshlan@jinr.ru](mailto:koshlan@jinr.ru)

*Summary.* Resume. In experiments conducted on the cells of the Chinese hamster line V79, the mutagenic effect of heavy charged particles was investigated. HPRT mutagenesis, chromosomal aberrations and structural disorders of the gene in spontaneous and irradiated cells were analyzed for a long time of expression (up to 45 days) after exposure to radiation with different physical characteristics. The maximum yield of mutant clones was observed at different expression times depending on the characteristics of ionizing radiation. In the tested range of LPE emissions, the position of the maximum yield of the mutant fraction shifted towards an increase in the expression time at higher LPE. In the long term after irradiation, the level of mutagenesis decreased even below the spontaneous level. Chromosomal aberrations throughout the entire study period (up to 45 days) gradually decreased to the control level. Radiation-induced mutants with <sup>11</sup>B ions showed an increase in the proportion of deletion mutants with an increase in the radiation dose (up to ~70%). In spontaneous mutants, deletion samples were no more than 10% of the total number of samples studied.

*Keywords:* V79 hamster cells, HPRT mutagenesis, irradiation, accelerated heavy ions, genomic instability, LET, chromosomal aberrations

Воздействие ускоренных тяжелых ионов на клетки млекопитающих и проявления отдаленных эффектов у потомков находятся в фокусе фундаментальных радиобиологических исследований [1,2,3]. Повышенное внимание к исследованию воздействия ускоренных ионов с высоким зарядом и высокой энергией на биологические объекты наблюдается в связи с подготовкой к долгосрочным межпланетным полетам за пределы магнитосферы земли, например, на Марс, где основной вклад в эквивалентную дозу космонавтов составят высокоэнергетические и тяжело заряженные частицы Галактического Космического Излучения [4], а также в связи с расширением использования тяжелых ионов в терапии рака [5].

*Целью работы* явилось исследование отсроченных генетических эффектов в клетках китайского хомячка V79 после воздействия излучений с разными физическими характеристиками. В ходе исследования особое внимание уделялось индукции мутаций в гене HPRT на протяжении длительного времени экспрессии (до 40 суток), а также анализу хромосомных нарушений и структурных изменений в *hprt*-гене у мутантов, индуцированных излучениями с разной ЛПЭ.

*Материалы и методы исследования.* Для облучения клеток использовали излучения разного качества:  $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$  с расчетным ЛПЭ  $\sim 0,23$  кэВ/мкм, ускоренные тяжелые ионы  $^{18}\text{O}$ ,  $^{20}\text{Ne}$  и  $^{11}\text{B}$  с ЛПЭ в диапазоне от 49 до 149 кэВ/мкм. Во всех экспериментах как с редко-, так и с плотноионизирующим излучением экспоненциально растущие клетки облучали в виде суспензии в стандартной питательной среде в концентрации  $10^6$  клеток/мл. После облучения клетки высевали в соответствующих концентрациях для экспрессии мутаций в стандартную среду ДМЭМ, содержащую 10% сыворотки, глутамин и антибиотик. Через каждые трое суток клетки пассировали. При пересеве часть суспензии использовали для исследования мутагенеза. Клетки сеяли на селективную среду с 6-тиогуанином для выявления мутантных клонов. Каждый выделенный клон впоследствии был исследован на предмет хромосомных нарушений и наличие структурных нарушений в *hprt*-гене.

*Результаты работы и обсуждение.*

В ходе работы было обнаружено, что выход фракции мутантов является немонотонной функцией и зависит от сроков посева облученных клеток («времени экспрессии» мутаций) на селективную питательную среду с 6-тиогуанином и качества излучения. Для излучений с низким ЛПЭ, в частности гамма-квантов, эта функция монотонно уменьшается на протяжении всего исследования. С увеличением ЛПЭ излучения максимальный выход мутантов сдвигался в сторону более длительных времен экспрессии с последующим снижением уровня мутагенеза до показателей спонтанного мутагенеза. В диапазоне от 49 до 149 кэВ/мкм зависимость максимального положения по выходу мутантов от ЛПЭ излучения может быть описана экспоненциальной функцией. На основании проведенных исследований можно предположить, что повышенный уровень радиационно-индуцированного мутагенеза определяется возросшей хромосомной нестабильностью популяции облученных клеток, и его проявление в разные «времена экспрессии» зависит от тяжести первоначальных повреждений.

Выход радиационно-индуцированных мутантов в разные времена экспрессии соотносили с количеством и типом хромосомных aberrаций на одинаковых сроках исследования. Сопоставление данных HPRT-мутагенеза и хромосомных нарушений на протяжении длительного периода исследования (до 45 суток) выявило постепенное снижение как уровня мутагенеза, так и выхода хромосомных aberrаций. Обнаружено, что при высоких дозах  $\gamma$ -облучения уровень хромосомных нарушений в отдаленные сроки наблюдений не только снижается до спонтанного уровня, но и становится даже ниже значений спонтанного мутагенеза. Аналогичная картина наблюдалась после

облучения ускоренными ионами бора. Это может указывать на некие различия в природе спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза.

Наряду с исследованием хромосомных aberrаций у потомков облученных клеток, был проведен анализ aberrаций у HPRT-мутантных субклонов и их отдаленных потомков (после ~ 40 генераций). У потомков облученных к этим срокам наблюдений уровень ХА снижался до спонтанных значений вне зависимости от дозы облучения.

Параллельно с исследованием уровня мутагенеза, хромосомных aberrаций у потомков облученных клеток был проведен анализ повреждений *hprt*-гена. В ходе исследования методом ПЦР структурных нарушений в *hprt*-гене у спонтанных и радиационно-индуцированных мутантных субклонов отмечается возрастание частоты встречаемости мутантов с делециями разного вида: как частичных, так и полных, у мутантов. В HPRT мутантных клетках, облученных тяжелыми ионами  $^{11}\text{B}$  в дозах 0,5, 1 и 2 Гр, доля делеций разного вида возросла до 46% после облучения в дозе 1 Гр и увеличилась до 67% после облучения в дозе 2 Гр. Спонтанные мутанты в основном характеризуются наличием точковых мутаций до 80-90%, а делеционные образцы представляют собой единичные экземпляры с выпадением единичных экзонов, и их доля составляет не более 10-20% от общего числа. Подобные данные для спонтанных HPRT-мутантов опубликованы в работе по исследованию молекулярной природы спонтанно возникающих и индуцированных рентгеновскими лучами мутаций в соматических клеточных системах млекопитающих методом Саузерн-блоттинга [6].

Поддержание генетической целостности является ключевым процессом жизнеспособности клеток. Нарушение этой целостности является причиной геномной нестабильности [7], приводит к накоплению хромосомных aberrаций и мутаций, которые могут быть ответственны за возникновение онкогенеза [8].

Полученные данные свидетельствуют о возникновении и сохранении хромосомной нестабильности в поколениях облученных клеток. Наблюдаемая вариабельность полученных данных по мутагенезу, цитогенетическим показателям и данным молекулярного анализа, по-видимому, определяется типом возникающих мутаций у спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов после воздействия излучений разного качества. Последствия этого воздействия могут проявляться в длинном ряду клеточных поколений. И могут быть связаны не только с точковыми мутациями, но и со структурными изменениями гена.

#### Список литературы

1. *Michaletou, T.D., Michalopoulos I, Costes S. V. et al.* 2021. V. 11. Iss. 2. № 115.
2. *Okayasu R.* 2012. V. 130. № 5. P. 991-1000.
3. *Yatagai F.* Biological Sciences in Space. 2004. V. 18. № 4. P. 224-234.
4. *Fogtman A., Baatout S., Baselet B. et al.* *NPJ Microgravity*. 2023. V. 9. №. 8.
5. *Hellweg C.E., Chishti A.A., Diegeler S. et al.* International Journal of Particle Therapy. 2018. V. 5. № 1. P. 60–73.
6. *Sankaranarayanan K.* Mutation Research. 1991. V. 258. № 1. P. 75-97.
7. *Sumption N., Goodhead D.T. and Anderson R M.* PLoS One. 2015. V. 10. № 8.
8. *Kanagaraj K., Rajan V., Pandey B.N. et al.* International Journal of Radiation Biology. 2019. V. 95. № 12. P. 1648-1658.

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ВАРИАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ  
КРОВИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ УГЛЕРОДА ИЛИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*Е.А. Кузнецова<sup>1</sup>, О.М. Розанова<sup>1</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>1</sup>, С.И. Глухов<sup>1</sup>, Т.В. Сирота<sup>1</sup>,  
Т.А. Белякова<sup>2</sup>, Н.П. Сирота<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
Пушино Московской области, Россия

<sup>2</sup> «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н.Лебедева, Протвино  
Московской области, Россия

e-mail: [kuzglu@rambler.ru](mailto:kuzglu@rambler.ru)

*Резюме.* Изучение биологических эффектов фотонов и ускоренных частиц на живые организмы связано с решением проблем космобиологии и медицины. Аутбредные мыши были облучены ускоренными ионами углерода (450 МэВ/нуклон) в пике Брэгга или рентгеновским излучением в дозе 6,5 Гр. Определяли выживаемость, а также методом ДНК-комет – уровни повреждений ДНК (%TDNA) в лейкоцитах крови за сутки до и через 1–23 сут у <sup>12</sup>C-облученных и через 1–28 сут у облученных рентгеновскими лучами мышей. Обнаружили большее повреждающее действие ионов углерода по сравнению с рентгеновскими фотонами по обоим критериям, а также у индивидуальных животных существенные вариации %TDNA, которые, по-видимому, могут служить причиной индивидуальных различий при развитии нестабильности генома в отдаленные сроки. Можно полагать, что более высокий %TDNA лейкоцитов <sup>12</sup>C-облученных мышей, его больший диапазон и несинхронность изменений у индивидуумов в постлучевом периоде связаны с возникновением кластерных повреждений в ДНК и дисфункцией митохондрий, а также обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами. Выявленные различия у индивидуальных лабораторных животных требуют дальнейшего изучения для совершенствования животных моделей в свете развития персонализированной биомедицины.

*Ключевые слова:* метод ДНК-комет, рентгеновское излучение, ускоренные ионы углерода, повреждения ДНК лейкоцитов, индивидуальные животные

**SURVIVAL AND VARIATIONS IN DNA DAMAGES IN BLOOD LEUKOCYTES OF  
INDIVIDUAL MICE AT DIFFERENT TIMES AFTER EXPOSURE TO CARBON  
IONS OR X-RAY**

*E.A. Kuznetsova<sup>1</sup>, O.M. Rozanova<sup>1</sup>, E.N. Smirnova<sup>1</sup>, S.I. Glukhov<sup>1</sup>, T.V. Sirota<sup>1</sup>,  
T.A. Belyakova<sup>2</sup> and N.P. Sirota<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

<sup>2</sup>Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,  
Protvino, Moscow Region, 142281 Russia

e-mail: [kuzglu@rambler.ru](mailto:kuzglu@rambler.ru)

*Summary.* The study of the biological effects of photons and accelerated particles on living organisms is associated with solving problems of cosmobiology and medicine. Outbreed mice were irradiated with accelerated carbon ions (450 MeV/nucleon) at the Bragg peak or X-rays at a dose of 6.5 Gy. Survival was determined, as well as the levels of DNA damage by the comet assay (%TDNA) in blood leukocytes a day before and after 1–23 days for <sup>12</sup>C-irradiated mice and after 1–28 days for mice irradiated with X-rays. We found a greater damaging effect of carbon ions compared to X-ray photons by both criteria, as well as significant variations in %TDNA in individual animals, which, apparently, can cause

individual differences in the development of genome instability in the long term. It can be assumed that the higher %TDNA of leukocytes in  $^{12}\text{C}$ -irradiated mice, its greater range, and the asynchrony of changes in individuals in the post-irradiation period are associated with the occurrence of clustered DNA damage, mitochondrial dysfunction, and are also due to genetic and epigenetic factors. The revealed differences in individual laboratory animals require further study in order to improve animal models in the light of the development of personalized biomedicine.

*Keywords:* comet assay, X-ray irradiation, accelerated carbon ions, DNA damage in leukocytes, individual animals

Результатом воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на живые клетки/организмы при радиотерапии или космических полетах является поражение клеточных структур, в частности, ДНК, в которой регистрируют различные повреждения – разрывы, повреждение или утрата оснований, сшивки; особенностью действия ускоренных тяжелых ионов на клетки является индукция кластерных повреждений ДНК. Побочным эффектом воздействия ИИ при радиотерапии и долговременных космических полетах является возникновение злокачественных новообразований. Поэтому изучение биологических эффектов воздействия фотонов/ускоренных частиц на биологических моделях – животных актуально для понимания последствий, как космических полетов, так и применяемых протоколов лечения онкологических пациентов. Цель работы: оценить уровни повреждений ДНК (%TDNA) лейкоцитов крови у индивидуальных животных в отдаленные сроки после воздействия на мышей ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6,5 Гр, сравнить динамику изменений %TDNA лейкоцитов с таковой после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе.

Обнаружено большее повреждающее действие ионов углерода по сравнению с рентгеновскими лучами по критериям выживаемости и %TDNA, а также у индивидуальных животных существенные вариации %TDNA. Динамика изменений %TDNA у индивидуальных мышей, выживших к 28 сут после рентгеновского облучения, была сходная. Динамика изменений %TDNA лейкоцитов крови на 1–23 сут после облучения ионами углерода была более выражена по сравнению с рентгеновскими лучами: различия %TDNA на 16 сут после облучения между мышами №№ 1 и 2, 2 и 3, 2 и 4, 3 и 5, а также на 23 сут между мышами 2 и 4, 2 и 5, 3 и 5, 4 и 5 статистически достоверны ( $p < 0,05$ ). Поскольку у индивидуальных животных наблюдалась выраженная гетерогенность по %TDNA лейкоцитов в пострадиационном периоде, то был проведен анализ спонтанного уровня %TDNA у интактных мышей, который отражает процессы возникновения и репарации повреждений, поскольку ДНК постоянно подвергается окислению и спонтанной тепловой и гидролитической деградации. Несинхронность варибельности %TDNA у индивидуальных животных, по-видимому, отчасти обусловлена их генетическими особенностями (поскольку использованные аутбредные мыши SHK отличаются большой генетической гетерогенностью и эпигенетической регуляцией), а также может быть связана и с другими факторами. Можно было бы ожидать, что в случае облучения интактных мышей с разными контрольными значениями %TDNA в пострадиационном периоде могла по-разному развиваться лучевая реакция у индивидуумов. Оказалось, что мыши, на которых оценивалась динамика в течение 23–28 сут, характеризовались примерно одинаковыми низкими спонтанными значениями %TDNA. При этом радиационно-индуцированный %TDNA у индивидуумов существенно варьировал. При сравнении динамики изменений %TDNA при  $^{12}\text{C}$ -облучении с таковой при воздействии рентгеновских лучей у индивидуальных животных обнаружено, что и диапазон

значений %TDNA, и их вариабельность наиболее явственно выражены при  $^{12}\text{C}$ -облучении. Возможно, что эта несинхронность изменений %TDNA связана также с активными формами кислорода, формирующимися внутри клетки в постлучевом периоде вследствие индуцированной облучением дисфункции митохондрий [1]. Полученные результаты указывают на необходимость оценки состояния лейкоцитов крови животных с гетерогенным генетическим фоном методом ДНК-комет перед облучением для формирования группы с близкими значениями %TDNA.

Итак, различия в динамике пострадиационных изменений %TDNA, выявленных с помощью метода ДНК-комет у индивидуальных животных в отдаленные сроки после  $^{12}\text{C}$ - или рентгеновского облучения, по-видимому, обусловлены не только генетическими и эпигенетическими факторами, но и различным типом повреждений, индуцируемых этими воздействиями. Значение вариаций уровня повреждений ДНК отдельных лабораторных животных в формировании отдаленных последствий на организменном уровне требует дальнейшего исследования для разработки новых и совершенствования традиционных подходов с использованием моделей животных в свете развития как персонализированной биомедицины, так и применения их для доклинического исследования источников ядерной медицины.

**БЛАГОДАРНОСТИ:** Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику Лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ “Курчатовский институт” Пикалову В.А. за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании “Радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70” и сотруднику Лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН Заичкиной С.И. за инициирование данного исследования.

Работа была выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury // *Cancer Lett.* 2012. V. 327. P. 48-60. doi: [10.1016/j.canlet.2011.12.012](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012)



## ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ РАДИОПРОТЕКТОРЫ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ

*П.Н. Лобачевский*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

e-mail: lobachevsky@jinr.ru

*Резюме.* Широко известный флуоресцентный краситель ДНК бис-бензимидазол Hoechst 33342 и ряд его аналогов, связывающихся в малой бороздке ДНК, обладают радиозащитными свойствами. Эти свойства продемонстрированы в опытах на культуре клеток и на различных моделях животных. В экспериментах на молекулярном уровне установлено, что защитное действие этих соединений опосредовано связанным с ДНК лигандом. Предполагается, что радиопротектор выступает в роли донора электронов для восстановления оксидативных повреждений ДНК.

*Ключевые слова:* радиопротектор, ДНК-лиганд, повреждения ДНК

## DNA-BINDING RADIOPROTECTORS AND MECHANISM OF THEIR ACTION

*P. N. Lobachevsky*

Joint institute for nuclear research, Dubna, Russia

*Summary.* The well-known fluorescent DNA dye bis-benzimidazole Hoechst 33342 and a number of its analogues, which are DNA minor groove binders, exhibit radioprotective properties. These properties were demonstrated in studies with cell culture and in various animal models. In experiments at the molecular level, it was found that the protective effect of these compounds is mediated by the DNA bound ligand. It is assumed that radioprotector acts as an electron donor for the repair of oxidative damage to DNA.

*Key words:* radioprotector, DNA ligand, DNA damage

Радиозащитные свойства флуоресцентного красителя ДНК Hoechst 33342, который связывается с ДНК в малой бороздке, впервые были обнаружены в экспериментах с культурой клеток [1]. Для интерпретации этого неожиданного наблюдения была предложена гипотеза о том, что радиозащитное действие этого соединения опосредовано восстановлением оксидативных повреждений ДНК путем передачи к ним электрона от ДНК-лиганда. Исходя из гипотезы, было синтезировано несколько новых соединений с целью повышения радиозащитной активности путем введения в молекулу лиганда богатых электронами групп. Эти новые соединения, такие как метилпроамин (МП) и пироамин (ПА), построены на общей с Hoechst 33342 структуре бис-бензимидазола и связываются с ДНК в малой бороздке в АТ-богатых участках последовательности ДНК. Константа диссоциации, характеризующая степень связывания комплексов ДНК-лиганд для этих соединений, находится в диапазоне 0,1 - 10  $\mu\text{M}$ , и на каждые 20 - 50 пар оснований приходится один сайт связывания.

Эксперименты по импульсному радиолизу комплексов МП и Hoechst 33342 с ДНК предоставили дополнительные данные в поддержку гипотезы о том, что механизм защитного действия этих соединений опосредован переносом заряда между связанным с ДНК лигандом и короткоживущим радиационно-индуцированным радикалом ДНК [2]. Результаты этой работы позволили оценить диапазон миграции заряда вдоль ДНК, который составил 14 и 31 пару оснований для Hoechst 33342 и МП соответственно.

В экспериментах с культурой кератиноцитов человека (линия FEP-1811) была показана эффективная защита клеток от летальных последствий облучения  $\gamma$ -квантами ( $^{137}\text{Cs}$ ) в среде, содержащей МП или ПА. Фактор изменения дозы (ФИД), характеризующий степень защиты, составил 2,1 и 2,3 для концентраций 10 и 20  $\mu\text{M}$  МП

соответственно, и 2,3 и 2,6 для концентраций 10 и 20  $\mu\text{M}$  ПА соответственно. Увеличение концентрации МП в среде приводило к выходу ФИД на плато при концентрациях, обеспечивающих насыщение лигандом сайтов связывания на ДНК, что косвенно указывает на роль именно ДНК-связанного лиганда в обеспечении радиозащитного эффекта [3]. Характерно, что для достижения радиозащитного эффекта требуется концентрация МП или ПА, которая почти на два порядка меньше, чем концентрация одного из самых распространенных радиопротекторов аминотиола WR1065, для которого ФИД  $\sim 2$  достигается при концентрации 4 - 5 mM. Это указывает на высокую эффективность ДНК-связывающихся радиопротекторов.

Использование метода подсчета флуоресцентных фокусов модифицированного гистона H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ), являющегося маркером двунитевых разрывов ДНК, позволило установить, что МП эффективно защищает облученные клетки от этих повреждений [3]. Величины ФИД по этому критерию составили от 1,4 до 3,5 для различных интервалов времени инкубирования в присутствии 20  $\mu\text{M}$  МП перед облучением.

Радиозащитное действие МП и ПА было также показано в экспериментах с лабораторными животными, с использованием модели Withers у мышей, которая заключается в подсчете жизнеспособных единиц пролиферации (крипт) в срезах тонкого кишечника после облучения. Величины ФИД = 1,2 при облучении мышей после введения 150 мг/кг МП или ПА. Результаты указывают на потенциал этих соединений для защиты нормальных тканей.

В настоящей работе была предпринята попытка получить дополнительные результаты, поддерживающие сформулированную выше гипотезу, с использованием молекулярной радиобиологической экспериментальной модели. Ставилась задача подтвердить роль именно ДНК связанного лиганда в радиозащитном действии и установить, имеет ли место альтернативный механизм, ассоциированный с перехватом радиационно-индуцированных гидроксильных радикалов в окружающем растворе.

В работе использовали модель плазмидной ДНК (плазмида pBR322). Эта модель основана на том, что исходная суперспиральная форма плазмиды трансформируется в открытую релаксированную кольцевую форму вследствие индукции одного одностевого разрыва (ОР) ДНК или в линейную форму вследствие индукции двунитевого разрыва (ДР) ДНК. Все три формы плазмидной ДНК могут быть разделены с помощью агарозного геля электрофореза, и доля каждой формы может быть определена количественно исходя из интенсивности индивидуальных полос в геле, окрашенных с помощью ДНК специфичного флуоресцентного красителя SYBR Green. Выход ОР и ДР ДНК может затем быть рассчитан исходя из этих долей. Кроме выхода ОР и ДР ДНК, модель позволяет определить выход некоторых поврежденных оснований (ПО), таких, например, как 8-оксогуанин. Для этого раствор плазмидной ДНК после облучения обрабатывают ферментом гликозилазой, принимающим участие в репарации ПО и приводит на начальном этапе к образованию ОР на месте ПО. В настоящей работе использовали фермент формамидопиримидин гликозилазу (ФПГ).

Поскольку ПО представляли наибольший интерес в данной работе, облучение плазмиды проводили в буферном растворе, благоприятствующем образованию ПО в ущерб ОР ДНК. Этот раствор содержал 1 mM тиоцианата натрия, который перехватывает радиационно-индуцированные радикалы гидроксила с образованием более слабого окислительного радикала тиоцианата, вызывающего образование преимущественно ПО, а не ОР ДНК.

ДНК плазмиды pBR322 (11,4  $\mu\text{M}$  пар оснований) облучали  $\gamma$ -квантами ( $^{137}\text{Cs}$ ) в диапазоне доз до 100 Gy в растворе, содержащем различные концентрации МП или ПА, а затем по дозовым кривым форм плазмиды вычисляли ФИД и степень защиты,

определенную как доля повреждений (ПО или ОР), образование которых предупреждается радиопротектором. Результаты экспериментов продемонстрировали высокую радиозащитную активность МП и ПА в отношении ПО ДНК и существенно меньшую активность в отношении ОР ДНК. Величины ФИД составили для 1  $\mu\text{M}$  ПА 1,1 в отношении защиты от ОР ДНК и 18,1 в отношении защиты от ПО ДНК. Эти величины соответствуют степени защиты 0,13 и 0,94. Т.о. 1  $\mu\text{M}$  ПА предупреждает образование 94% потенциальных ПО ДНК. Для 2  $\mu\text{M}$  МП величины ФИД составили 1,2 и 9,4 в отношении ПО и ОР ДНК и соответствующие им величины степени защиты 0,18 и 0,9. Эти результаты подчеркивают высокую способность ДНК лигандов МП и ПА восстанавливать короткоживущие радикалы ДНК, например, радикал-катион гуанина - предшественник ПО 8-оксогуанина, и низкую способность восстанавливать предшественники разрывов ДНК. Последнее наблюдение указывает также на низкую эффективность перехватывания гидроксильных радикалов этими соединениями.

Степень защиты ДНК от ПО изучали при концентрациях ПА от 0,1 до 10  $\mu\text{M}$ . В этом диапазоне происходило увеличение степени защиты от 0,4 с насыщением до 0,94 при концентрации 0,5 - 1  $\mu\text{M}$ . При дальнейшем увеличении концентрации ПА степень защиты не увеличивается, что согласуется с насыщением всех сайтов связывания на плазмиде молекулами лиганда. Данное наблюдение поддерживает гипотезу о том, что именно ДНК-связанный радиопротектор отвечает за защиту. Проведенный в рамках этой гипотезы расчет показывает, что передача заряда вдоль ДНК происходит на расстоянии до 40 - 50 пар оснований.

В серии экспериментов с разными концентрациями ПА в буфер для облучения добавляли ДНК-носитель – синтетический олигодеоксинуклеотид, состоящий из 16 пар оснований и содержащий единичный сайт связывания ДНК лиганда (GAATTC) в концентрации 50  $\mu\text{M}$  пар оснований. В присутствии ДНК носителя степень защиты резко снижалась, например, с 80 до 10% при 0,2  $\mu\text{M}$  ПА. Кривая зависимости степени защиты от концентрации ПА сдвигалась в сторону более высоких концентраций. Данное наблюдение легко поддается объяснению, если предполагать, что радиозащитное действие ПА обусловлено связанным с ДНК лигандом, а добавление ДНК носителя связывает большую часть лиганда, тем самым уменьшая количество его молекул, связанных с плазмидной ДНК. Данная интерпретация поддерживается также наблюдением, что кривые степени защиты практически совпадают, если представить их зависимость не от концентрации лиганда, а от отношения лиганд/сайт.

В другой серии экспериментов с разными концентрациями ПА в буфер для облучения добавляли ДНК лиганд, который не имеет радиозащитных свойств, но конкурирует с ПА за сайты связывания ДНК (его константа диссоциации 50 нМ, а у ПА 200 нМ). При концентрации конкурирующего лиганда 0,15  $\mu\text{M}$  степень защиты уменьшалась с 95 до 60% для 1  $\mu\text{M}$  ПА. Это наблюдение можно интерпретировать, предполагая, что именно ДНК-связанный ПА обеспечивает защиту, соответственно степень защиты уменьшается при уменьшении количества связанного с ДНК лиганда. Кроме того, этот результат указывает на то, что защитное действие ПА не связано с перехватом радиационно-индуцированных радикалов в растворе.

Таким образом, полученные результаты поддерживают гипотезу о том, что радиозащитное действие ДНК-лигандов обусловлено связанным с ДНК радиопротектором, который способен восстанавливать предшественники повреждений оснований путем переноса к ним электрона.

1.Young, S.D., Hill, R.P. Br J Cancer. 1989. V.60. P.715.

2.Martin, R.F., Anderson, R.F. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998. V.42. №4. P.827.

3.Lobachevsky, P.N. et al. Int J Radiat Biol, 2011. V.87. №3. P.274.

## **ТРЕХЦВЕТНОЕ FISH-ОКРАШИВАНИЕ: УЧАСТИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОСОМОВ В РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ТРАНСЛОКАЦИЯХ**

*E.E. Ломоносова<sup>1</sup>, В.Ю. Нугис<sup>1</sup>, М.Г. Козлова<sup>1</sup>, В.А. Никитина<sup>1</sup>,  
Г.П. Снизирёва<sup>2</sup>, А.Н. Галстян<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

e-mail: [mrs.lomonosova@gmail.com](mailto:mrs.lomonosova@gmail.com); [nugisvju@list.ru](mailto:nugisvju@list.ru)

*Резюме.* Изучалось относительное участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных транслокациях с контрокрашенными хромосомами. Использовали два набора трёхцветных ДНК-зондов к парам целых хромосом {1, 4, 12} и {2, 3, 8}. Материалом служили культуры лимфоцитов облучённой *in vitro* крови здоровых доноров и крови пациента в отдалённые сроки после аварийного радиационного воздействия. Сделан вывод о прямо пропорциональной связи процесса с количеством содержащегося в хромосомах ДНК.

*Ключевые слова:* гамма-облучение, транслокации, трёхцветный FISH-метод, ДНК-зонды.

## **THREE-COLOR FISH PAINTING: PARTICIPATION OF INDIVIDUAL CHROMOSOMES IN RADIATION-INDUCED TRANSLOCATIONS**

*E.E. Lomonosova<sup>1</sup>, V.Yu. Nugis<sup>1</sup>, M.G. Kozlova<sup>1</sup>, V.A. Nikitina<sup>1</sup>,  
G.P. Snigiryova<sup>2</sup>, I.A. Galstyan<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

e-mail: [mrs.lomonosova@gmail.com](mailto:mrs.lomonosova@gmail.com); [nugisvju@list.ru](mailto:nugisvju@list.ru)

*Summary.* The relative participation of different FISH painting chromosomes in radiation-induced translocations with counterstained chromosomes was studied. Two sets of three color DNA probes were used for pairs of whole chromosomes {1, 4, 12} and {2, 3, 8}. The material was lymphocyte cultures of *in vitro* irradiated blood of healthy donors and the patient's blood in the long-term period after accidental radiation exposure. It was concluded that the process is directly proportional to the amount of DNA contained in the chromosomes.

*Key words:* gamma-irradiation, translocations, three-color FISH method, DNA probes.

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) относят к молекулярно-цитогенетическим методикам, т.к. в её основе лежит гибридизация специфических ДНК-зондов с выбранными участками хромосом. В настоящее время различные варианты цельнохромосомного FISH-метода могут быть применены для ретроспективной биологической индикации дозы. При использовании трёхцветного или многоцветного FISH-метода возникает возможность оценить радиочувствительность отдельных пар хромосом на основе цитогенетического анализа культур лимфоцитов как после облучения крови здоровых доноров *in vitro*, так и в отдалённые сроки у пациентов, пострадавших ранее в различных аварийных ситуациях.

Перерасчёт количества транслокаций на весь кариотип при анализе ограниченного числа FISH-окрашенных пар хромосом основан на представлении о том, что вероятность индукции двойных разрывов ДНК пропорциональна её содержанию в отдельных парах хромосом. Подтверждение данного положения является актуальным и позволяющим сравнивать данные разных авторов. В нашем исследовании применили трёхцветную FISH-методику с использованием наборов ДНК-зондов к {1, 4, 12} и {2, 3, 8} парам хромосом для изучения транслокаций в культурах лимфоцитов облучённой *in vitro* (гамма-лучи  $^{60}\text{Co}$ , от 0,1 до 3,0 Гр) периферической крови трёх здоровых доноров (2 мужчин и 1 женщина, 28-41 лет). По суммарному относительному содержанию ДНК оба выбранных набора идентичны друг другу, доля ДНК в них по отношению к диплоидному набору хромосом у мужчин / женщин равняется 0,1917 и 0,1966 / 0,1887 и 0,1933 соответственно. Существенные отличия между двумя разными использованными наборами ДНК-зондов при определении фонового и индуцированных при разных дозах частотах транслокаций отсутствовали: уровень значимости  $p$  варьировал от 0,124 до 0,928. С помощью регрессионного анализа по методу наименьших квадратов были получены следующие линейно-квадратичные дозовые зависимости для частот транслокаций при использовании наборов ДНК-зондов к {1, 4, 12} и {2, 3, 8} парам хромосом:

$$Y = (0,21 \pm 0,54) + (1,34 \pm 1,14) \times D + (2,35 \pm 0,39) \times D^2, \quad (1)$$

$$Y = (0,25 \pm 0,38) + (1,05 \pm 0,79) \times D + (2,27 \pm 0,27) \times D^2, \quad (2)$$

где  $Y$  – частота транслокаций на 100 всех клеток,  $D$  – доза, Гр.

Рассматривали относительное участие разных FISH-окрашенных хромосом в радиационно-индуцированных транслокациях с контрокрашенными хромосомами раздельно для каждого донора и для всех них вместе. Для сравнения использовали критерий  $\chi^2$ , значимое отличие наблюдалось только между донорами 1 и 3 по хромосоме 2. При дальнейшей статистической обработке показана существенность большего числа транслокаций с участием пар хромосом в ряду  $1 > 4 > 12$  ( $p < 0,0001$ ), а также для пар  $2 > 8$  и  $3 > 8$  ( $p < 0,0001$ ). Только между парами 2 и 3 хромосом при относительных содержаниях ДНК у мужчин / женщин, равных соответственно 0,0804 / 0,0790 и 0,0674 / 0,0663, различия были незначимы ( $p = 0,606$ ), что, по-видимому, связано с разрешением FISH-метода. При этом сравнение между эмпирическими и расчётными частотами участия отдельных пар хромосом в транслокациях, исходя из табличных соотношений содержания в них ДНК, показало их примерное совпадение ( $p$  варьировало от 0,1110 до 0,6026).

Цитогенетическому исследованию также были подвергнуты культуры лимфоцитов периферической крови пациента, пострадавшего при аварии на Чернобыльской АЭС. Оценка дозы по частоте дицентриков в лимфоцитах венозной крови непосредственно после облучения, составила 3,2 Гр. Материал для повторных анализов был получен в общем временном промежутке 10195-12554 дней (27,9-34,4 лет) после радиационного воздействия. Во все сроки 10 раз были использованы наборы ДНК-зондов к {1, 4, 12} и параллельно 5 раз – к {2, 3, 8} парам хромосом. Основную массу наблюдаемых aberrаций хромосом составляли относящиеся к стабильному типу реципрокные транслокации в количестве от 90,4 до 98,4% от общего числа всех зарегистрированных перестроек. В ходе цитогенетического анализа были обнаружены два лимфоцитарных клона с транслокациями  $t(4;8)$  и  $t(1;3)$ . Без и с коррекцией на наличие клонов для набора ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом по частоте образования транслокаций с контрокрашенными хромосомами окрашенные хромосомы располагались в следующем порядке:  $1 > 4 > 12$  ( $p < 0,0001$ ). Для набора ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом без указанной коррекции существенных различий между этими хромосомами не наблюдалось ( $p = 0,125-0,671$ ), несмотря на установленную разницу

относительного содержания ДНК в них. После коррекции на клональность по степени участия в этих транслокациях наблюдалось следующее расположение рассматриваемых хромосом:  $2 > 8$  ( $p < 0,0001$ ) и  $3 > 8$  ( $p = 0,023$ ). Различие между парами хромосом 2 и 3 было незначимым ( $p = 0,108$ ).

При сравнении между эмпирическими и расчётными частотами участия отдельных FISH-окрашенных пар хромосом в транслокациях, исходя из табличных величин относительного содержания в них ДНК, были получены противоречивые результаты. При использовании набора ДНК-зондов к 1, 4 и 12 парам хромосом без коррекции на наличие клонов доля транслокаций с участием хромосомы 1 соответствовала её относительной длине, тогда как для хромосом 4 и 12 этот показатель был значимо (при  $p < 0,05$ ) соответственно выше и ниже расчётных значений. После коррекции на наличие клонов для хромосомы 1 участие в транслокациях было выше ожидаемого, а для хромосом 4 и 12 – ниже ожидаемого. При применении набора ДНК-зондов к 2, 3 и 8 парам хромосом без коррекции на наличие клонов транслокаций с 2 и 8 хромосомами было соответственно меньше и больше предполагаемой частоты, а для хромосомы 3 их количество не отличалось от теоретических ожиданий. После проведения коррекции для всех хромосом данного набора различия по ожидаемому количеству транслокаций с контрокрашенными хромосомами отсутствовали. По-видимому, расхождение результатов, полученных с использованием разных наборов ДНК-зондов, обусловлено наличием нераспознанного(ых) клон(ов) с участием 1 хромосомы. Возрастание доли транслокаций с участием этой хромосомы автоматически приводит к снижению вклада других хромосом из используемого набора ДНК-зондов. В основе данной точки зрения лежит приведенное выше представление о прямо пропорциональной зависимости величины вероятности индукции двойных разрывов ДНК её относительному содержанию в отдельных парах хромосом. Таким образом, если производится оценка сравнительного участия разных хромосом в реципрокных транслокациях, то, в отличие от ретроспективной оценки дозы, осуществление коррекции на наличие клональных перестроек становится обязательным. Отклонения частот от ожидаемых величин, по-видимому, может свидетельствовать о нераспознанных клонах клеток. Среди выбранных пар хромосом {1, 4, 12} и {2, 3, 8} вероятность образования радиационно-индуцированных транслокаций с контрокрашенными хромосомами прямо пропорциональна относительному количеству содержащейся в них ДНК.

**ОЦЕНКА ДВУХНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ  
УЛЬТРАКОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ  
В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

*A.T. Manukyan<sup>1,2,\*</sup>, N. S. Babayan<sup>1,2</sup>, P. M. Grigoryan<sup>2</sup>, H. K. Sarkisyan<sup>1</sup>, B. A. Grigoryan<sup>3</sup>,  
R.M. Arutiounian<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии НАН Республики Армения, Ереван

<sup>2</sup> Ереванский государственный университет, Ереван, Республика Армения

<sup>3</sup> Институт синхротронных исследований "КЕНДЛ", Ереван, Республика Армения

\*e-mail: [alisa.manukyan1@ysu.am](mailto:alisa.manukyan1@ysu.am)

Резюме. Ускоренные электроны являются одним из основных источников ионизирующей радиации, используемой в настоящее время при лучевой терапии опухолей. Основной задачей нашего исследования стала влияние малых доз на образование гистонов  $\gamma$ H2AX в нормальных (MRC 5) и опухолевых (A549) клетках человека.

Ключевые слова: лазерные ускорители; АРЕАЛ; ультракороткий импульсный электронный пучок; повреждение ДНК;  $\gamma$ H2AX, MRC5; A549

**ASSESSMENT OF DOUBLE-STRAND DNA BREAKS AFTER IRRADIATION  
WITH ULTRASHORT PULSES OF ELECTRON BEAMS IN HUMAN CANCER  
AND NORMAL CELLS**

*A.T. Manukyan<sup>1,2,\*</sup>, N. S. Babayan<sup>1,2</sup>, R.M. Grigoryan<sup>2</sup>, N.K. Sarkisyan<sup>1</sup>, B.A. Grigoryan<sup>3</sup>,  
R.M. Arutiounian<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology of NAS, Hasratyan 7, 0014, Yerevan, Armenia

<sup>2</sup>Yerevan State University, Alex Manoogian 1, 0025, Yerevan, Armenia

<sup>3</sup>CANDLE Synchrotron Research Institute, Acharyan 31, 0040, Yerevan, Armenia

\*e-mail: [alisa.manukyan1@ysu.am](mailto:alisa.manukyan1@ysu.am)

Summary. Accelerated electrons are one of the main sources of ionizing radiation currently used in radiation therapy of tumors. The main goal of our study was the analysis of the effect of low doses on induction of  $\gamma$ H2AX histones in normal (MRC 5) and tumor (A549) human cells.

Keywords: laser-driven accelerators; AREAL; ultrashort pulsed electron beam; DNA damage;  $\gamma$ H2AX, MRC5; A549

Ускорители на основе фемтосекундных лазеров позволяют генерировать ультракороткие (субпикосекундные) пучки ускоренных частиц с пиковой мощностью дозы до десятков ГГр/сек в течение импульса [1]. Роль генетических и эпигенетических факторов в развитии эффектов субпикосекундного импульсного облучения клеток малоисследована. Таким образом, изучение генетических эффектов лазерно-генерируемого излучения высокоскоростных электронов является актуальным и перспективным направлением в области радиобиологии. Лазерные пучки частиц, генерируются линейным ускорителем "АРЕАЛ" в Синхротронном научно-исследовательском институте "КЕНДЛ" (Армения) [2]. Воздействие ионизирующего излучения приводит к повреждению ДНК, образуя двухцепочечные и одноцепочечные разрывы. Двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР) являются наиболее опасными и часто связаны с мутациями, включая хромосомные aberrации, связанные с опухолеобразованием [3]. Микроскопический анализ очагов H2AX является наиболее чувствительным методом выявления ДНК ДЦР индуцированную электронным пучком,

в определённые моменты времени, в отдельных ядрах, с использованием изображений полученные с иммуноцитохимии. [4, 5]

Целью нашего исследования был сравнительный анализ количественного выхода фосфорилированных очагов гистона  $\gamma$ H2AX в нормальных и опухолевых клетках легкого человека.

### **Материалы и методы.**

**Культивирование:** Эксперименты были выполнены на культурах карциномы легкого (A549) и фибробластов легкого эмбриона человека (MRC5) (ATCC). Клетки культивировались в флаконах T25 (Corning), в среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), содержащей 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), с антибиотиками, в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), со сменой среде каждые 3сутки. Клетки были облучены при конfluence ~80%.

**Облучение клеток:** для облучения ультракороткими пучками ускоренных электронов было использовано линейный ускоритель AREAL. Клетки были облучены в дозах 1, 0.5 Gy, (NT-не облучается).

**Основные параметры пучка:** энергия пучка - 3.6 МэВ, заряд импульса – 30 пКл, длительность импульса – 0.4 пс, пиковая мощность –  $1.6 \times 10^{10}$  Гр/с, частота импульсов – 20 Гц, поперечные размеры пучка электронов – 15 мм, разброс энергии ~ 1.5%. Дозиметрию проводили в реальном времени с использованием ячейки Фарадея [2].

**Фиксация клеток:** после облучения чашки Петри промыть 1.5мл PBS раствором 2 раза. Добавить 1.5мл 2% параформальдегида (PF) и оставлять при комнатной температуре 20 мин. После слить PF и промыть 1.5мл Wash Buffer. После слить и добавить 1.5мл Blocking Buffer. Инкубировать 40мин, при комнатной температуре. Развести первичные антитела в Dilution Buffer. Накапать на стекла по 30 мкл первичных антител. Инкубировать час, в темном месте при комнатной температуре. Развести вторичные антитела в Dilution Buffer. Промыть 1.5мл Wash Buffer. Нанести на стекла по 30 мкл вторичных антител и инкубировать в темном месте при комнатной температуре 1ч. Промыть 1.5мл Wash Buffer 2 раза. На предметные стекла накапать по 20мкл DAPI краситель. Положить покровные стекла клетками на краситель. Заклеить края бесцветным лаком.

Эксперимент по иммунофлуоресцентному окрашиванию  $\gamma$ H2AX проводили с использованием моноклональных антител к  $\gamma$ H2AX (Merck-Millipore) согласно условиям протокола производителей (Life Technologies). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Iscope (Euromex, Нидерланды). Для каждой точки данных анализировали не менее 200 клеток. Эксперимент повторяли не менее 3 раз. Очаги подсчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ.

### **Анализ данных**

Статистический анализ данных был проведен с использованием GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка.

### **Результаты и обсуждения**

Был проведен количественный анализ фокусов  $\gamma$ H2AX через 1ч после облучения ультракороткими импульсами электронных пучков. Общий уровень повреждений ДНК в клетках A549 был выше по сравнению с клетками MRC5 при всех дозах облучения. В опухолевых клетках количество фокусов после излученные 1 Гр было в 6 раз выше по



сравнению с контролем ( $32.29 \pm 4.0$ ), и в 1.5 раза больше по сравнению с клетками MRC5 ( $21.3 \pm 3.2$ ). При облучении 0.5 Гр в клетках MRC5 количество фокусов  $\gamma$ H2AX в 3.2 раза больше контроля ( $13.1 \pm 1.9$ ) и в 1.4 раза меньше чем A549 ( $18.95 \pm 2.5$ ).

### **Выводы**

Показан процент клеток с более высоким количеством  $\gamma$ H2AX при облучении в дозе 1 Гр по сравнению с облучением в дозе 0.5 Гр в нормальных и опухолевых клетках. В случае опухолевых клеток, процент образования фокусов  $\gamma$ H2AX был выше, чем в нормальных клетках, что может свидетельствовать о формировании сложно-репарируемых повреждений ДНК, приводящий к гибели клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы научных исследований аспирантов Государственного комитета по науке РА-2021 “21AA-1F034” и программы поддержки молодых ученых “22YSSPD-020”.

### **Литература**

1. Manti L, Perozziello F, Borghesi M, et al. The radiobiology of laser-driven particle beams: focus on sublethal responses of normal human cells. *J. Instrumentation*. 2017;12(03):C03084.
2. Tsakanov V., Aroutiounian R., Babayan N., et al., AREAL low energy electron beam applications in life and materials sciences., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.*, 2016; 829: 248–253.
3. van Gent D C, Hoeijmakers J H, Kanaar R.. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection *Nat. Rev. Genet.* 2001 2 196–206
4. Okunola H., Shuryak I., Repin M., et al., Improved prediction of breast cancer risk based on phenotypic DNA damage repair capacity in peripheral blood B cells *Res Sq.* 2023 Jun 27;rs.3.rs-3093360.
5. Sak A., Stuschke M., Use of  $\gamma$ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy, *Semin Radiat Oncol* 2010 Oct;20(4):223-31.

## СТРАТЕГИЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

*Мельникова А.А.<sup>1</sup>, Киркин Р.С.<sup>1</sup>, Комарова Л.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия  
e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

*Резюме.* За последние годы стратегия применения наноструктурированных контейнеров для целевой доставки лекарственных средств захватывала внимание исследователей в области биологии и медицины. Модификация поверхности наночастиц полиэтиленимином (PEI) и (2-аминоэтил)-3-аминопропилтриметоксисилоном (DAMO-P) позволяет напрямую взаимодействовать с раковыми клетками и эффективно проникать в ее микроокружение по сравнению с традиционными системами доставки.

*Ключевые слова:* наноматериалы, мезопористый кремний, функционализация наночастиц, DAMO-P, PEI.

## TARGETED DRUG DELIVERY STRATEGY

*Melnikova A.A.<sup>1</sup>, Kirkin R.S.<sup>1</sup>, Komarova L.N.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia  
e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

*Summary.* In recent years, the strategy of using nanostructured containers for targeted drug delivery has captured the attention of researchers in the field of biology and medicine. Modification of the surface of polyethylenimine (PEI) and (2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane (DAMO-P) nanoparticles allows direct interaction with cancer cells and effective penetration into its microenvironment compared to traditional delivery systems.

*Keywords:* nanomaterials, mesoporous silicon, functionalization of nanoparticles, DAMO-P, PEI.

Целевая доставка лекарственных препаратов – это доставка их способом, управляемым во времени и пространстве, с необходимой скоростью высвобождения и определённой продолжительностью. Подобный уровень контроля позволяет избежать неблагоприятных эффектов, обусловленных физико-химическими биофармацевтическими свойствами некоторых лекарственных средств, и впоследствии повысить терапевтическую эффективность и безопасность.

Стратегия направленной лекарственной доставки является современным направлением повышения эффективности фармакотерапии. Центральным вопросом этой технологии является разработка дисперсных транспортных систем (ДТС) для целевого биораспределения вводимых лекарственных веществ [1].

Одним из перспективных направлений для решения проблем эффективной доставки лекарств является использование пористых неорганических материалов на основе кремния.

В текущем исследовании использовались мезопористые наночастицы размером 120 нм. Наночастицы были получены методами лазерной абляции и фрагментации в жидкости. Лазерная абляция в жидкости позволяет синтезировать новые ультрачистые наноматериалы (без побочных загрязнений), которые могут внести решающий вклад в биомедицинских применениях. Лазерно-синтезированные наноматериалы могут

обладать практически нулевой токсичностью и быть биоразстворимыми, не оставляя после себя никаких токсичных следов [2].

С целью повышения функциональности наночастиц осуществлялась модификация их поверхности различными агентами (функционализация), обеспечивающими повышенную эффективность загрузки препарата и более равномерное его высвобождение. В ходе работы были синтезированы наночастицы, функционализированные полиэтиленгликолем (PEG) и (2-аминоэтил)-3-аминопропилтриметоксисилоном (DAMO-P) [3].

В работе был рассмотрен цитотоксический эффект полученных наночастиц при доставке миРНК в культуры опухолевых клеток человека линий MCF-7 и HeLa *in vitro*.

### Список литературы

1. Спивак, Ю.М. и др. Пористый кремний как наноматериал для дисперсных транспортных систем направленной лекарственной доставки ко внутреннему уху / Ю.М. Спивак и др. // Журнал технической физики. – 2018. – Т. 88, № 9. – С. 1394-1403.
2. Попов, А. Синтез наночастиц для биомедицинских применений методами лазерной абляции и фрагментации в жидкости [Электронный ресурс] / А. Попов, Г. Целиков, А. Кабашин // Научный семинар ИФИБ, Москва, Россия. – Режим доступа: [https://physbio.mephi.ru/wp-content/uploads/2018/11/Popov\\_Presentation.pdf](https://physbio.mephi.ru/wp-content/uploads/2018/11/Popov_Presentation.pdf) (дата посещения – 03.04.2023).
3. Zhang, M. et al. Polycation-functionalized nanoporous silicon particles for gene silencing on breast cancer cells / M. Zhang et al. // Biomaterials. – 2014. – V. 35(1). – P. 1-21.

## **БЕЛОК PARP1 И СПОСОБЫ ЕГО ИНГИБИРОВАНИЯ**

*Мельникова А.А.<sup>1</sup>, Киркин Р.С.<sup>1</sup>, Комарова Л.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия  
e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

*Резюме.* PARP1 – ключевой фермент, регулирующий канцерогенные изменения в клетке, он рассматривается как важная молекулярная мишень для разрабатываемых противоопухолевых препаратов, а ингибиторы PARP1 считаются перспективными противоопухолевыми средствами. В ходе исследования был осуществлён дизайн последовательности миРНК против PARP1, не затрагивающей другие гены.

*Ключевые слова:* PARP1, таргетная терапия опухолевых заболеваний, ингибирование PARP1, противоопухолевые препараты.

## **PARP 1 PROTEIN AND METHODS OF INHIBITION**

*Melnikova A.A.<sup>1</sup>, Kirkin R.S.<sup>1</sup>, Komarova L.N.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia  
e-mail: angelik\_melnikova@mail.ru

*Summary.* PARP1 is a key enzyme regulating carcinogenic changes in the cell, it is considered as an important molecular target for antitumor drugs being developed, and PARP1 inhibitors are considered promising antitumor agents. In the course of the study, the design of the miRNA sequence against PARP1, which does not affect other genes, was carried out.

*Keywords:* PARP1, targeted therapy of tumor diseases, inhibition of PARP 1, antitumor drugs.

Самым известным и широко изученным ферментом PARP-класса является ядерный белок PARP1, который принимает участие в важнейших клеточных процессах (репарация ДНК, рекомбинация, репликация и др.). Ген PARP1, кодирующий одноимённый белок, находится на длинном плече хромосомы 1 (1q42.12). При взаимодействии белка PARP1 с участками ДНК, содержащими одно- и двунитевые разрывы, повышается его активность, что способствует восстановлению нормальной структуры ДНК. Чем больше повреждений содержится в цепи ДНК, тем выше активность фермента PARP1. Однако вследствие чрезмерной активности данного белка происходит дефицит NAD<sup>+</sup> и АТФ в клетке, что впоследствии может привести к энергетической недостаточности и апоптозу клетки [1].

PARP1 в качестве потенциальной молекулярной мишени широко используется при разработке препаратов-онкосупрессоров. Это обусловлено высокой экспрессией данного гена при меланоме, раке легкого, молочной железы и других онкологических заболеваниях. Ингибиторы PARP1 могут самостоятельно являться полноценными противоопухолевыми лекарственными препаратами в случае нарушений определенных путей репарации ДНК [2]. Потенциальным способом снижения влияния этого фактора ещё на стадии трансляции белка является РНК-интерференция [3]. Малые интерферирующие РНК имеют большой потенциал широкого применения в биомедицине, в частности, при лечении злокачественных новообразований.

Для проникновения миРНК в клетку-мишень необходимо разработать способ их транспортировки, контролируемый в пространстве и времени. Перспективным направлением для решения этой проблемы является использование высокостабильных пористых наночастиц на основе кремния.

Для того, чтобы «выключить» экспрессию гена PАРP1, мы осуществляли дизайн миРНК, то есть составляли определённую последовательность, способную комплементарно связаться с матричной РНК (мРНК) с помощью базы данных по геному человека UCSC Genome Browser Калифорнийского университета. Далее мы генерировали правильную последовательность миРНК, а также отрицательный контроль с тем же нуклеотидным составом, что и выбранная миРНК. Необходимые олигонуклеотиды были синтезированы на автоматическом синтезаторе амидофосфитным методом. В дальнейшем проводились эксперименты по образованию РНК-дуплексов и загрузке РНК в наночастицы.

### Список литературы

1. Долгашева, Д.С. и др. Ингибиторы PАРP1 в терапии рака молочной железы. Механизм действия и клиническое применение / Д.С. Долгашева и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2020. – Т. 16, № 1. – С. 55-64.
2. Малюченко, Н.В. и др. Ингибиторы PАРP1: разработка противоопухолевых препаратов / Н.В. Малюченко и др. // АСТА NATURAE. – 2015. – Т. 7, № 3(26). – С. 30-41.
3. Шевелёв, А.Я. и др. РНК-интерференция: система тестирования эффективности мишеней / А.Я. Шевелёв и др. // Кардиологический вестник. Бюллетень Российского кардиологического научно-производственного комплекса. – 2010. – Т. 5 (17), № 2. – С. 22-30.

## **ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ КРИТЕРИЯМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС**

*Нагиба В.И., Варганова И.А., Паточка Г.Л.*

Российский федеральный ядерный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики (РФЯЦ-ВНИИЭФ), г. Саров, Россия  
e-mail: [nagiba@orb2.vniief.ru](mailto:nagiba@orb2.vniief.ru)

*Резюме.* В серии экспериментов изучены модифицирующие эффекты низкоинтенсивного импульсного магнитного поля (НМП) частотой 100 Гц при действии на лабораторных животных, предварительно подвергнутых воздействию электромагнитного излучения (ЭМИ) частотой 1МГц и циклофосфида (CF). Показано, что НМП заданных параметров обладает модифицирующим эффектом, выраженным в снижении уровня хромосомных aberrаций, индуцированных действием ЭМИ и CF в клетках костного мозга. НМП заданных параметров подавляет пролиферативную активность костного мозга животных.

*Ключевые слова:* низкоинтенсивное импульсное магнитное поле, электромагнитное излучение, циклофосфамид, мутагенез, хромосомные aberrации, пролиферация, ДНК.

## **TO STUDY OF MODIFYING EFFECTS OF CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS ACCORDING TO CYTOGENETIC CRITERIA IN RAT BONE MARROW CELLS**

Nagiba V.I., Varganova I.A., Patochka G.L. Russian Federal Nuclear Center - All-Russian Research Institute of Experimental Physics (RFNC-VNIIEF), Sarov, Russia  
e-mail: [nagiba@orb2.vniief.ru](mailto:nagiba@orb2.vniief.ru)

*Summary.* In a series of experiments, the modifying effects of a low-intensity pulsed magnetic field (NMF) with a frequency of 100 Hz were studied when acting on laboratory animals previously exposed to electromagnetic radiation (EMR) with a frequency of 1 MHz and cyclophosphamide (CF). It is shown that the NMR of the specified parameters has a modifying effect, expressed in a decrease in the level of chromosomal aberrations induced by the action of EMR and CF in bone marrow cells. NMP of the specified parameters suppresses the proliferative activity of the bone marrow of animals.

*Key words:* low-intensity pulsed magnetic field, electromagnetic radiation, cyclophosphamide, mutagenesis, chromosomal aberrations, proliferation, DNA.

Биологическая система, испытывающая внешнее действие факторов различной физической природы, способна обнаруживать их присутствие и изменять свою собственную активность в зависимости от характеристик действующих факторов. Человеку приходится сталкиваться с источниками электромагнитного излучения (ЭМИ) при самых разных обстоятельствах. Для того чтобы спрогнозировать последствия поражения организма, вовремя оказать эффективную помощь, необходимо иметь достоверную информацию об эффективности действия ЭМИ с конкретными характеристиками. В настоящее время важными с точки зрения медицинских применений являются области низких частот, которые широко используются в различных методах лечения широкого класса заболеваний. Исследования разных авторов показали, что низкоинтенсивное магнитное поле (НМП) способно вызывать как положительные, так и отрицательные биологические эффекты.

**Целью** работы явилось изучение радиомодифицирующих свойств низкоинтенсивного магнитного поля (НМП), электромагнитного излучения (ЭМИ) и химического мутагена циклофосаида. Выполнена серия из трех экспериментов.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали НМП формируемые амплитудно – модулированными импульсами частотой 100 Гц со средними значениями модуля магнитной индукции МП1 – 1,4 мТл, и МП2 – 3,15 мТл и ЭМИ частотой 1000 Гц, с максимальным значением плотности потока энергии (ППЭ) не превышающим 8 мВт/см<sup>2</sup>. Для моделирования химически индуцированного мутагенеза использовали циклофосамид (CF) с концентрацией 15 мг/кг массы животного.

Объектом исследования служили беспородные крысы-самцы массой 300 - 400 г, в количестве 71 особи, находившихся в стандартных условиях содержания и кормления лабораторного вивария. Оценку результатов экспериментов проводили по частоте хромосомных aberrаций (ХА) в клетках костного мозга (КМ).

Анализировали по 100 метафаз от каждого животного. Учитывали одиночные фрагменты, делеции, межхромосомные обмены, разрывы по центромере, число aberrантных клеток, митотический индекс.

**Результаты.** Установлено, что действие ЭМИ выбранных параметров достоверно повышает частоту хромосомных aberrаций в клетках КМ относительно контроля ( $p \leq 0,05$ ). При сочетанном действии ЭМИ и CF происходит возрастание частоты ХА химически индуцированного мутагенеза в клетках костного мозга животных ( $p \leq 0,05$ ), и усиливается пролиферативная активность клеток КМ животных.

НМП снижает уровень хромосомных aberrаций, индуцированных действием ЭМИ и CF в клетках костного мозга животных ( $p \leq 0,05$ ). НМП выбранных параметров подавляет пролиферативную активность костного мозга животных ( $p \leq 0,05$ ).

**Обсуждение.** Физические механизмы биологических эффектов магнитных полей пока полностью не изучены. В работах разных авторов указывается на возможность синергизма биологических эффектов, обусловленных различными физическими механизмами. Для описания реакции живого организма на действие магнитного поля необходимо использовать как физические, так и биологические параметры. Обычно физиологические параметры живой системы меняются за время эксперимента даже в отсутствии какого-либо воздействия. На молекулярном уровне изменение физиологического состояния живой системы связано с изменением ферментативной активности. Квантовомеханический подход предполагает нелинейную зависимость вероятности конформационного отклика фермента, т.е. изменение скорости ферментативной реакции, от плотности вероятности волновой функции иона [1]. Описываются ион-радикальные механизмы, ферментативных реакций синтеза АТФ и репликации ДНК. Ключевым элементом служит ион-радикальная пара, в которой конкуренция физических и химических процессов управляется магнитными взаимодействиями [2]. На основании экспериментальных данных высказываются предположения о зависимости скорости окислительно-восстановительных процессов от внешнего магнитного поля. Значительное снижение частоты ХА в клетках костного мозга при сочетанном воздействии CF+НМП может быть обусловлено снижением эффективности окислительно-восстановительных процессов от действия НМП и индукцией апоптоза клеток с повреждениями ДНК.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют, что НМП заданных параметров обладает модифицирующим эффектом, ослабляющим действие физических и химических факторов по индукции хромосомных aberrаций в клетках костного мозга животных, а также оказывает ингибирующее действие на клеточные системы обеспечивающие процессы синтеза и репарации ДНК, что приводит к снижению пролиферации клеток красного костного мозга животных.

### **Список литературы.**

1. Тирас Х.П., Петрова О.Н., Мякишева С.Н. и др. Биологические эффекты слабых магнитных полей: сравнительный анализ // *Фундаментальные исследования*, 2014 – № 12-7 – С. 1442-1451
2. Бучаченко А.Л. Магнито-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине // *Успехи химии* - 2014. – Т. 83, № 1. – С. 1 – 12



## **ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОЦИТОВ СТРИОПАЛЛИДАРНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*Насонова Н.А., Соколов Д.А., Кварацхелия А.Г.*  
ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж, Россия  
e-mail: [veravgma@yandex.ru](mailto:veravgma@yandex.ru)

*Резюме.* В результате проведенного эксперимента на на 186 половозрелых беспородных крысах-самцах после воздействия однократного облучения  $\gamma$ -квантами ( $^{60}\text{Co}$ ) в дозе 0,5 Гр установлено, что данная доза вызывает адаптационные (компенсаторно-приспособительные) изменения в ранние и отдаленные сроки пострadiационного периода. Эти изменения заключались в расширении объема физиологической изменчивости нейроцитов в пределах минимальных и максимальных значений биологической нормы, отражающей различные уровни функциональной активности клеток и не превышающей границы физиологической деструкции и развивающихся по гипо-, нормо- и гиперхромному типам. Выявленные изменения тинкториальных свойств нейроцитов свидетельствовали об незначительных колебаниях значений ядерной ДНК.

*Ключевые слова:* малые дозы радиационного воздействия, головной мозг, ядерная ДНК

## **CHANGES IN THE NEUROCYTES OF THE STRIOPALLIDAR SYSTEM UNDER THE ACTION OF IONIZING RADIATION**

*Nasonova N.A., Sokolov D.A., Kvaratskhelia A.G.*  
N.N. Burdenko Russian State Medical University of the Ministry of Health of Russia,  
Voronezh, Russia

*Summary.* As a result of the experiment conducted on 186 sexually mature mongrel male rats after exposure to a single irradiation with gamma quanta ( $^{60}\text{Co}$ ) at a dose of 0.5 Gy, it was found that this dose causes adaptive (compensatory-adaptive) changes in the early and long-term periods of the radiation period. These changes consisted in the expansion of the volume of physiological variability of neurocytes within the minimum and maximum values of the biological norm, reflecting different levels of functional activity of cells and not exceeding the limits of physiological destruction and developing hypo-, normal- and hyperchromic types. The revealed changes in the tinctorial properties of neurocytes indicated slight fluctuations in the values of nuclear DNA.

*Keywords:* small doses of radiation exposure, brain, nuclear DNA

Одной из наиболее значимых проблем радиобиологии является изучение последствий облучения в различных отделах ЦНС. Целью нашего исследования было изучение морфофункциональных изменений клеток бледного шара при воздействии однократного облучения  $\gamma$ -квантами ( $^{60}\text{Co}$ ) в дозе 0,5 Гр в ранние и отдаленные сроки пострadiационного периода.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент спланирован и проведен в ГНИИИ ВО МО РФ (Москва) на 186 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 200–230 г, объединенных в 31 группу. Животные подвергались общему равномерному однократному гамма-облучению ( $^{60}\text{Co}$ ) в дозе 0,5 Гр. Объектом исследования на фронтальных срезах головного мозга крыс явились нейроциты бледного шара и хвостатого ядра. Кусочки мозга фиксировали в формалине и заливали в парафин. Подсчет нейроцитов с различными формами морфологической

изменчивости [3,4] проводили на срезах окрашенных гематоксилином и эозином и толуидиновым синим по Нисслю. Полученные данные обрабатывались статистически.

**Результаты и обсуждение.** При оценке морфофункциональных изменений нейроцитов стриопаллидарной системы в пострадиационном периоде выделены стадии: начальных проявлений, выраженных изменений и восстановления. Стадия начальных проявлений (первые пять часов после воздействия) характеризуется пограничными изменениями, сопровождающимися незначительным снижением биоэнергетических процессов. Наличие нейроцитов с пограничными и деструктивными изменениями свидетельствует о высокой чувствительности нервной системы к действию ионизирующего излучения. В стадию выраженных изменений (в течении 14 суток) в нейронах стриопаллидарной системы возникают умеренно выраженные альтеративные (деструктивные) изменения, проявляющиеся в виде коагуляционного и колликвационного нейронекрозов, гипохромной гидропической нейронодистрофией и умеренного снижения проницаемости стенки капилляров стриопаллидарной системы в сочетании с развитием адаптационных (компенсаторно-приспособительных) изменений. В стадию восстановления (от 14-х сут. до 1 г.) происходила постепенная нормализация соотношения различных морфологических типов нейронов хвостатого ядра и бледного шара.

**Заключение.** Таким образом, в конце срока наблюдения преобладали адаптационные (компенсаторно-приспособительные) изменения, заключающиеся в расширении объема физиологической изменчивости нейроцитов в пределах минимальных и максимальных значений биологической нормы, отражающей различные уровни функциональной активности клеток и не превышающей границы физиологической деструкции и развивающихся по гипо-, нормо- и гиперхромному типам.

### Список литературы

1. Ильичева В. Н., Ушаков Б.Н. Характеристика различных в филогенетическом отношении зон коры головного мозга крыс / В. Н. Ильичева, Б. Н. Ушаков // Российский медико-биологический вестник имени Павлова. – 2012. – № 3. – С. 17-20.
2. Моделирование изменений в коре головного мозга при малых радиационных воздействиях / О. П. Гундарова, В. П. Федоров, А. Г. Кварацхелия, Н. В. Маслов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 15-26. – DOI 10.18499/2225-7357-2022-11-2-15-26. – EDN QONPZG.
3. Насонова Н.А., Соколов Д.А. Структурно-функциональная характеристика стриопаллидарной системы при облучении ионизирующим излучением в малых дозах // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2013. – Т.2 – №1(5) –С.43-45.
4. Сравнительная характеристика изменений нейронов головного мозга при однократном и пролонгированном радиационном воздействии / О. П. Гундарова, В. П. Федоров, А. Г. Кварацхелия, Н. В. Маслов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 35-46. – DOI 10.18499/2225-7357-2021-10-3-35-46. – EDN RLKGCL.
5. Федоров В.П., Петров А.В., Ильичева В.Н., Соколов Д.А., Терезанов О.Ю., Насонова Н.А., Сгибнева Н.В., Фетисов С.О., Гундарова О.П. Возрастная экологическая нейроморфология ЦНС при действии малых доз облучения // Морфология. – 2008. – Т. 133, № 2. – С.142.

## ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ГАММА-НЕЙТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

*Посыпанова Г.А.<sup>1</sup>, Осипов А.А.<sup>2</sup>, Жирник А.С.<sup>1</sup>, Семочкина Ю.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup>ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н.Семенова, Москва, Россия

e-mail: galinapo@gmail.com

*Резюме.* Культивируемые нейральные стволовые клетки (НСК) облучали в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов реактора ИР-8. Исследована пролиферативная активность НСК, механизмы гибели, формирование и репарация двунитевых разрывов ДНК, индукция дифференцировки. Дозозависимое снижение пролиферативной активности НСК коррелировало со снижением уровня Ki67. Репарация двунитевых разрывов ДНК проходила медленно и не завершалась через 24 ч после облучения.

*Ключевые слова:* нейральные стволовые клетки, дифференцировка, нейтроны, радиочувствительность, двунитевые разрывы ДНК,  $\gamma$ H2AX.

## CHARACTERISTIC OF THE RESPONSES OF CULTURED NEURAL STEM CELLS TO GAMMA-NEUTRON RADIATION

*Posypanova G.A.<sup>1</sup>, Osipov A.A.<sup>2</sup>, Zhirnik A.S.<sup>1</sup>, Semochkina Yu.P.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

<sup>2</sup>N.N. Semenov FRC Chemical Physics, Moscow, Russia

e-mail: galinapo@gmail.com

*Summary.* Cultivated neural stem cells (NSCs) were irradiated in a collimated beam of neutrons and gamma rays from the IR-8 reactor. The proliferative activity of NSCs, the mechanisms of death, the formation and repair of DNA double-strand breaks, and the ability to differentiate have been studied. A dose-dependent decrease in the proliferative activity of NSCs correlated with a decrease in the level of Ki67. DNA DSB repair proceeded slowly and was not completed 24 h after irradiation.

*Key words:* neural stem cells, differentiation, neutrons, radiosensitivity, DNA double-strand breaks,  $\gamma$ H2AX.

Интерес к радиобиологии нейтронов во многом обусловлен, с одной стороны, растущей популярностью протонной терапии и, соответственно, увеличением числа установок для протонной терапии опухолей во всем мире, с другой стороны, необходимостью обеспечения радиационной безопасности во время длительных космических полетов. При протонной терапии вторичные нейтроны неизбежно образуются за пределами первичного поля. Считается, что поглощенная доза, вызванная этими вторичными нейтронами, невелика, особенно для современных установок с узконаправленным сканированием. Тем не менее, из-за высокой ОБЭ нейтронов даже низкие дозы могут вызывать нежелательные эффекты, наиболее серьезным из которых является индукция вторичных опухолей [1]. Во время космических полетов вторичные нейтроны образуются в результате ядерных взаимодействий с материалами космического корабля и с телом человека [2]. Поглощенная доза облучения экипажа считается низкой, но обычно 30–50% приходится на излучение с высокой ЛПЭ, такое как нейтроны. Таким образом, исследование влияния нейтронов на нормальные клетки организма является крайне актуальным.

Часто встречающимся осложнением лучевой терапии опухолей головного мозга является возникновение тяжелого нейрокогнитивного дефицита. К настоящему времени накапливается все больше экспериментальных данных о существовании связи между радиационно-индуцированным повреждением нейральных стволовых клеток мозга и нарушением нейрокогнитивных функций [3]. Нейральные стволовые клетки (НСК) определяют как недифференцированные клетки, способные к неограниченной пролиферации и самообновлению и обладающие мультипотентностью – способностью генерировать нейроны, астроциты и олигодендроциты.

Целью данной работы было изучение чувствительности культивируемых НСК мыши к реакторному гамма-нейтронному облучению в широком диапазоне доз (от 25 мГр до 2 Гр), особенностей формирования и восстановления двунитевых разрывов (ДР) ДНК в этих клетках, механизмов гибели и влияния облучения на дифференцировку.

**Методы.** НСК выделяли из головного мозга неонатальных мышей с помощью ферментативной дезагрегации и последующего культивирования в суспензии в виде нейросфер в бессывороточной среде. Полученную культуру характеризовали с использованием антител к специфическим поверхностным и внутриклеточным антигенам НСК, нейральных прогениторных клеток и дифференцированных клеток (астроцитов, нейронов, олигодендроцитов) с помощью проточной цитометрии.

Клетки облучали в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного водородного реактора ИР-8 (гамма-нейтронное ( $\gamma, n$ ) излучение). Расчетная мощность поглощенной дозы, приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась  $0,6 \pm 0,1$  Гр/ч. Из них 0,2 Гр/ч обусловлено облучением нейтронами (0,5 эВ – 10 МэВ), 0,4 Гр/ч – гамма-квантами (0,1–4 МэВ) с максимумом спектра в области 2 МэВ.

Выживаемость клеток оценивали путем подсчета количества живых клеток через 24–120 ч инкубации после облучения и анализа клоногенности – способности одиночных клеток формировать нейросферы. Уровень апоптоза анализировали с помощью проточной цитометрии после окрашивания клеток Аннексином V. Пролиферативную активность оценивали по включению EdU в ДНК клеток. Анализ клеточного цикла проводили с помощью проточной цитометрии после окрашивания фиксированных клеток йодистым пропидием. Долю пролиферирующих клеток определяли с помощью окрашивания НСК антителами к маркеру пролиферации Ki67. Количество ДР ДНК определяли путем подсчета фокусов фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX). Дифференцировку облученных НСК индуцировали удалением из культуральной среды факторов роста. Дифференцированные клетки окрашивали антителами к маркерам нейрональной ( $\beta$ -тубулин III) и астроцитарной (GFAP) дифференцировки. Стареющие клетки в культуре контрольных и облученных НСК определяли как клетки с высокой активностью  $\beta$ -галактозидазы.

**Результаты.** Обнаружено дозозависимое снижение выживаемости НСК после облучения в дозах свыше 100 мГр и стимуляция пролиферации этих клеток в дозах 25 и 50 мГр. По снижению выживаемости клеток действие гамма-нейтронного излучения существенно превосходило действие гамма-излучения: максимальное значение ОБЭ для  $\gamma, n$ -излучения составило 9,7. Обнаружено, что умеренные дозы  $\gamma, n$ -излучения индуцируют относительно быструю (по сравнению с  $\gamma$ -излучением) гибель НСК, главным образом, по механизму апоптоза. Максимальная гибель клеток наблюдалась в интервале 18–48 ч после  $\gamma, n$ -облучения, в то время как после облучения НСК  $\gamma$ -квантами основная гибель клеток наступала в интервале 48–72 ч. Гибель НСК сопровождалась дозозависимым снижением пролиферативной активности, блоком клеток в G0/G1 фазах клеточного цикла, развитием радиационно-индуцированного старения. По-видимому, указанные эффекты связаны, по крайней мере частично, с замедленной репарацией ДР ДНК (по сравнению с репарацией после облучения  $\gamma$ -

квантами), особенно выраженной в НСК, облученных в дозах 0,5 и 1 Гр. Считается, что медленная репарация ДР ДНК связана с образованием кластерных повреждений ДНК после облучения клеток ускоренными частицами.

Обнаружено, что гамма-нейтронное излучение, даже в таких низких дозах, как 25 и 50 мГр, снижало способность НСК к нейрональной дифференцировке. При этом наблюдалось значительное увеличение доли астроцитов. НСК, облученные в дозе 1 Гр, полностью теряли способность формировать нейроны, но не астроциты.

**Заключение.** Повреждения ДНК, вызванные гамма-нейтронным излучением, вызывают как быструю гибель НСК, так и остановку пролиферации с признаками клеточного старения. У выживших после облучения клеток нарушается нейрональная и усиливается астроглиальная дифференцировка.

#### **Список литературы.**

1. Schneider U., Hälg R. The Impact of Neutrons in Clinical Proton Therapy // *Frontiers in Oncology*. – 2015. – V. 5. – N. 235.
2. Cucinotta F.A., To K., Cacao E. Predictions of space radiation fatality risk for exploration missions // *Life Sciences in Space Research*. – 2017. – V. 13. – P. 1–11.
3. Pazzaglia S., Briganti G., Mancuso M., Saran A. Neurocognitive Decline Following Radiotherapy: Mechanisms and Therapeutic Implications // *Cancers (Basel)*. – 2020. – V. 12. – N. 146.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ  
В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ  
ПРОЛОНГИРОВАННОГО  $\gamma$ ,n-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ В НИЗКИХ ДОЗАХ**

*A. В. Родина<sup>1</sup>, О. В. Высоцкая<sup>1</sup>, И. В. Чешигин<sup>1</sup>, А. С. Журник<sup>1</sup>, Е. Ю. Москалева<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия, moskalevaey@mail.ru

*Резюме.* Пролонгированное  $\gamma$ ,n-облучение мышей в дозе 0,5 Гр, но не 0,05 Гр, через 2 мес приводило к снижению количества клеток покоящейся микроглии и повышению доли активированной. Экспрессия генов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 в гиппокампе была повышена при обеих дозах, что свидетельствует о развитии нейровоспаления. Состояние микроглии у облученных мышей через 1 год не отличалось от контроля. И через 2 мес, и через 1 год не обнаружено нарушений пространственной памяти, но при дозе 0,5 Гр через 1 год была снижена способность мышей к обучению.

*Ключевые слова:* микроглия, головной мозг, гиппокамп, экспрессия генов, провоспалительные цитокины, нейровоспаление, гамма-нейтронное излучение

**LONG-TERM EXPRESSION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE  
GENES IN THE HIPPOCAMPUS AFTER PROLONGED  $\gamma$ ,n-IRRADIATION OF  
MICE AT LOW DOSES**

*A. V. Rodina<sup>1</sup>, O. V. Vysotskaya<sup>1</sup>, I. V. Cheshigin<sup>1</sup>, A. S. Zhirnik<sup>1</sup>, E. Y. Moskaleva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>NRC Kurchatov Institute, Moscow, Moscow, Russia, e-mail: moskalevaey@mail.ru

*Summary.* Prolonged  $\gamma$ ,n-irradiation of mice at a dose of 0.5 Gy but not at 0,05 Gy after 2 months led to a decrease in the number of resting microglia and an increase in the proportion of activated ones. The expression of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 genes in the hippocampus was increased, indicating the development of neuroinflammation. The state of microglia in irradiated mice after 1 year did not differ from the control. Neither after 2 months nor after 1 year were there any impairment of spatial memory, but in a year at a dose of 0.5 Gy, the ability of mice to learn was reduced.

*Key words:* microglia, brain, hippocampus, gene expression, pro-inflammatory cytokines, neuroinflammation, gamma-neutron radiation

Изучение биологического действия нейтронов актуально в связи с развитием адронной терапии с применением протонов и нейтронов. Использование пучков протонов в терапии злокачественных опухолей сопровождается образованием вторичных нейтронов, которые могут оказывать негативное действие на нормальные ткани пациентов. Кроме того, облучению вторичными нейтронами в низких дозах могут подвергаться космонавты в дальних космических полетах, а также сотрудники предприятий атомной промышленности [1]. Учитывая высокую ОБЭ нейтронов, их действие может приводить к более тяжелому повреждению нормальных тканей, в том числе головного мозга при облучении опухолей в области головы и шеи, что может приводить к повреждению клеток мозга, а позднее к нарушению когнитивных функций, которое развивается в отдаленный период после воздействия. Так ОБЭ нейтронов в диапазоне низких доз для культивируемых нейтральных стволовых клеток мыши равна 5 при дозе 0,5 Гр, а репарация двунитевых разрывов ДНК, вызванных  $\gamma$ ,n-облучением, была более медленной, чем при  $\gamma$ -облучении [2]. Облучение нейтронами в настоящее время рассматривается как один из значительных факторов риска появления нарушений в функциях ЦНС и развития онкологических заболеваний в отдаленный период [3]. Один из важных механизмов развития нарушений когнитивных функций в отдаленный период после облучения обусловлен активацией клеток микроглии и

последующим развитием нейровоспаления, медиаторы которого повреждают нейроны. Особенно важно исследование таких процессов в гиппокампе для понимания механизмов нарушения гиппокамп-зависимой памяти. В связи с этим целью работы явилось исследование влияния пролонгированного  $\gamma$ ,n-облучения мышей в дозах 0,05 и 0,5 Гр на уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе, состоянии клеток мозга и когнитивные функции в отдаленный период – через 2 месяца и через 1 год после воздействия.

В экспериментах использовали самцов и самок мышей линии C57BL/6. Облучение мышей быстрыми нейтронами с сопутствующим  $\gamma$ -излучением проводили на установке «ОР-М» НИЦ «Курчатовский институт» с использованием нескольких Pu-Be радионуклидных источников при мощности поглощённой дозы нейтронов и гамма-квантов  $2,13 \times 10^{-3}$  Гр/ч, на нейтроны приходилось 75%. Гамма-облучение головы мышей в дозе 8 Гр проводили на установке «ГУТ-200М» при комнатной температуре при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Выделение клеток из головного мозга контрольных и облученных мышей проводили после транскардиальной перфузии. Фенотипирование клеток микроглии в выделенной суспензии клеток мозга мышей проводили с помощью окрашивания антителами к соответствующим антигенам. Клетки покоящейся микроглии идентифицировали как субпопуляцию  $CD11b^+/CD45^{low}$ , активированной микроглии и макрофагов – как  $CD11b^+/CD45^{high}$  с помощью проточной цитометрии. Анализ относительной экспрессии мРНК исследуемых генов в гиппокампе мышей проводили с помощью ОТ-ПЦР относительно экспрессии конститутивного гена *mGAPDH*. Результаты представляли как  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Анализ результатов проводили с использованием программы «Bio-Rad CFX Manager 2.0». Результаты представляли в виде средних значений  $\pm$  ошибка среднего. Для анализа поведения мышей использовали тест «открытое поле», для анализа пространственной памяти – тест «водный лабиринт Морриса». Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы OriginPro 9.1 при использовании t-критерия Стьюдента.

При исследовании состояния микроглии через 2 мес после  $\gamma$ ,n-облучения мышей в дозе 0,05 Гр не обнаружено статистически значимого изменения количества клеток покоящейся микроглии ни у самцов, ни у самок, а повышение количества клеток активированной микроглии и доли активированной микроглии в препаратах клеток мозга отмечено только у самок. После  $\gamma$ ,n-облучения мышей в дозе 0,5 Гр и у самцов, и у самок обнаружено снижение количества клеток покоящейся микроглии и повышение доли активированной микроглии, статистически значимое только у самцов. Установленные изменения в соотношении покоящейся и активированной микроглии свидетельствуют о развитии провоспалительного состояния в мозге после общего  $\gamma$ ,n-облучения мышей в дозе 0,5 Гр, а у самок и в дозе 0,05 Гр. Через 1 год после окончания  $\gamma$ ,n-облучения мышей самок в дозах 0,05 и 0,5 Гр не обнаружено статистически значимых отличий в количестве и соотношении клеток покоящейся и активированной микроглии от контрольных мышей соответствующего возраста, что свидетельствует о восстановлении тех нарушений в системе микроглии, которые наблюдали через 2 мес после воздействия в этих дозах. Однако при дозе 0,5 Гр отмечено статистически малозначимое снижение количества клеток покоящейся микроглии и повышение доли активированной, что свидетельствует о наличии значительных индивидуальных отличий по этим показателям у обследованных животных. При изучении чувствительности мозга мышей, переживших общее  $\gamma$ ,n-облучение в дозах 0,05 и 0,5 Гр, к последующему действию локального  $\gamma$ -облучения головы в дозе 8 Гр, исследовали влияние  $\gamma$ -облучения головы контрольных мышей и мышей, переживших за 1 неделю или за 1 год до этого общее  $\gamma$ ,n-облучение в дозах 0,05 и 0,5 Гр, на

состояние микроглии. При  $\gamma$ -облучении головы через 1 неделю после  $\gamma$ ,n-облучения отмечено только более значительное повышение активированной микроглии. Обнаружено снижение реактивности микроглии у старых мышей при  $\gamma$ -облучении мозга. Аналогичные изменения наблюдали у мышей, которые за год до облучения головы подвергались действию  $\gamma$ ,n-излучения в дозе 0,5 Гр,

При анализе уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе контрольных и облученных мышей показано, что через 2 мес после  $\gamma$ ,n-облучения мышей самцов в дозе 0,5 Гр имеет место двукратное повышение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  при снижении уровня экспрессии мРНК генов противовоспалительных цитокинов TGF $\beta$  и IL-4. После  $\gamma$ ,n-облучения в дозе 0,05 Гр обнаружено только двукратное повышение относительного уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов, аналогичное по уровню тому, которое регистрировали при  $\gamma$ -облучении головы мышей в дозе 2 Гр. Аналогичные результаты по уровню экспрессии генов провоспалительных цитокинов были получены при  $\gamma$ ,n-облучении самок мышей. Обнаруженные изменения свидетельствуют о развитии нейровоспаления в гиппокампе через 2 мес после пролонгированного  $\gamma$ ,n-облучения в обеих дозах и у самцов, и у самок. Оно было более выражено после облучения в дозе 0,5 Гр: при этой дозе регистрировалось увеличение доли активированной микроглии, и, наряду с повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов, было обнаружено снижение экспрессии генов противовоспалительных цитокинов. Через 1 год при дозе 0,5 Гр у облученных мышей в тесте «открытое поле» обнаружено увеличение времени пребывания в пристеночной зоне, что может свидетельствовать об увеличении тревожности животных. В тесте «водный лабиринт Морриса» показано снижение способности облученных мышей к обучению, но при тестировании через 24 ч после окончания обучения статистически значимых различий в параметрах, характеризующих состояние пространственной памяти, между контрольными и облученными мышами не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о развитии нейровоспаления через 2 мес после окончания пролонгированного  $\gamma$ ,n-облучения мышей в дозах и 0,05 и 0,5 Гр, которое, однако, не приводило к нарушению гиппокамп-зависимой пространственной памяти ни в этот период, ни через 1 год после облучения, когда регистрировалось только снижение способности мышей к обучению. Можно полагать, что провоспалительные изменения в мозге мышей, регистрируемые через 2 мес после  $\gamma$ ,n-облучения в дозе 0,05 Гр не приводят к когнитивным нарушениям, а облучение в дозе 0,5 Гр в отдаленный период может приводить к снижению способности мышей к обучению, обусловленному более глубоким повреждением нейронов.

### Список литературы

1. Stricklin DL, VanHorne-Sealy J, Rios CI, et al. *Radiat. Res.* 2021;195(5):480–496.
2. Posypanova G.A., Ratushnyak M.G., Semochkina Y.P., Strepetov A.N. *Intern J.Radiat Biol.* – 2022. – V. 98. – N. 10. – P. 1559–1570.
- 3, Acharya M.M., Baulch J.E., Klein P.M. et al. *eNeuro.* 2019. V. 6. N. 4. P. 1–15.



## **К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ ХЛОРОФИЛЛИНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ДНК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*Л.А. Ромодин, М.А. Игнатов*

Государственный научный центр – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия  
e-mail: rla2904@mail.ru

*Резюме.* Настоящая работа посвящена использованию хлорофиллина – водорастворимого производного зелёного пигмента растений хлорофилла – для защиты генетического аппарата от последствий действия ионизирующего излучения. В работе приводятся сведения от том, что хлорофиллин наиболее эффективен в тканях, состоящих из быстроделящихся клеток, так как при делении распадается ядерная мембрана, через которую в покоящейся клетке данное вещество не проходит.

*Ключевые слова:* ионизирующее излучение, радиопротектор, хлорофиллин, метод ДНК-комет, лимфоциты

## **ON THE USE OF CHLOROPHYLLIN TO PROTECT DNA WHEN EXPOSED TO IONIZING RADIATION**

*L.A. Romodin, M.A. Ignatov*

State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Agency, Moscow, Russia  
e-mail: rla2904@mail.ru

*Summary.* This work is devoted to the use of chlorophyllin, a water-soluble derivative of the green plant pigment chlorophyll, to protect the genetic apparatus from the effects of ionizing radiation. The paper provides information on the fact that chlorophyllin is most effective in tissues consisting of rapidly dividing cells, since during division the nuclear membrane disintegrates, through which this substance does not pass in a resting cell.

*Key words:* ionizing radiation, radioprotector, chlorophyllin, comet assay, lymphocytes

Несмотря на то, что проблемой разработки радиозащитных средств занимаются с середины прошлого века, считать её решённой на настоящий момент не приходится возможным. Это объясняется тем, что все по-настоящему эффективные радиопротекторы чрезвычайно химически токсичны. Это справедливо и к отечественному индралину [1], и к разработанному на Западе амифостину [2].

Поэтому в последнее время активно ведётся поиск нетоксичных радиозащитных препаратов. И большое внимание уделяется веществам, встречающимся в живой природе [3].

Радиозащитные свойства были обнаружены и у зелёного пигмента растений – хлорофилла [4], а также у хлорофиллина – водорастворимого продукта его омыления [5]. На основании совокупности проведённых исследований свойств хлорофиллина ранее был сделан вывод, что подавление каскада реакций перекисного окисления липидов играет важную роль в радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла.

Непосредственно сам хлорофилл выступал в роли объекта исследования радиозащитных свойств относительно редко. Обширные работы по изучению радиопротекторных свойств хлорофилла были проведены под руководством профессора Н.П. Лысенко. Из опубликованных результатов можно привести статью [4], являющуюся последней публикацией из указанного цикла работ. Внутримышечное

ведение хлорофилла увеличивало выживаемость мышей при внешнем облучении  $\gamma$ -излучением [4].

Радиозащитные свойства водорастворимого хлорофиллина изучались гораздо чаще. На лабораторных животных и культуре клеток было показано уменьшение выраженности процессов окислительного стресса, вызванного  $\gamma$ -излучением, под действием хлорофиллина [5].

В 1990-х годах было проведено исследование на предмет защитного действия хлорофиллина на генетический аппарат мышей, подвергнутых внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения. Оценка повреждения генетического аппарата была проведена методом определения сестринских хроматидных обменов. Считается, что данные обмены – это результат разрывов ДНК под действием излучения или радиационно-индуцированных активных форм кислорода. Сам по себе хлорофиллин никак не влиял на данный показатель. Хлорофиллин в дозе 100 мкг/г массы тела на 100 % предотвратил индицирование  $\gamma$ -излучением дозе 1 Гр сестринских хроматидных обменов в клетках костного мозга, 50 мкг/г – менее, чем наполовину, дозировка 10 мкг/г массы тела не обеспечила никакой защиты [6].

Схожее исследование было проведено при облучении мышей в дозе 0,75 Гр. Но в нём оценивались сестринские хроматидные обмены в сперматогониях [7]. В отличие от результатов, полученных для клеток костного мозга [6], доза хлорофиллина в 100 мкг/г массы тела снизила число сестринских хроматидных обменов в сперматогониях менее, чем наполовину. А полную защиту обеспечила лишь дозировка в 200 мкг/г массы тела [7]. Скорее всего, это связано с большей радиочувствительностью сперматогониев по сравнению с клетками костного мозга.

Мы провели эксперимент по изучению генозащитных свойств Na-Cu-хлорофиллина в диапазоне концентраций 0–100 мкМ на модели суспензии человеческих лимфоцитов, подвергнутых действию рентгеновского излучения в дозе 2 Гр. Для оценки повреждений ДНК был использован метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток. Степень повреждения ДНК лимфоцитов мы оценивали по двум показателям: проценту содержания ДНК в хвосте ДНК-кометы и моменту хвоста – произведению доли (не процента) содержания ДНК в хвосте на длину хвоста ДНК-кометы. И ни по одному из показателей лимфоциты, инкубированные в хлорофиллине, не отличались от контроля.

Проведённое в дальнейшем спектрофотометрическое исследование возможности проникновения Na-Cu-хлорофиллина из среды инкубации в цитоплазму показало достоверно более высокое, чем в среде, его содержание в лизате лимфоцитов, предварительно инкубированных в 300 мкМ хлорофиллине и очищенных от среды с помощью центрифугирования при 200 g в течение 20 минут с последующим лизированием 0,5% тритоном X-100. Это позволило предположить, что он проникает в цитоплазму по механизму активного транспорта. Скорее всего – за счёт трансмембранного переносчика гемовых групп, способного транспортировать порфирины. То есть мы получили сведения, что хлорофиллин поступает внутрь лимфоцитов и при этом не защищает их ДНК.

Однако ввиду сообщений о генопротекторных свойствах хлорофиллина [6, 7], мы не смогли сделать вывод о том, что данное вещество не способно защитить ДНК от радиационно-индуцированных повреждений.

Полученные нами данные хорошо согласуются с данными [6, 7] о генопротекторных свойствах хлорофиллина, если предположить, что он, имея способность проникать через плазмалемму из межклеточной среды в цитоплазму, не проникает из цитоплазмы через ядерную мембрану в ядро. И поэтому он не действовал в нашем эксперименте на лимфоцитах.

Авторы [6, 7] оценивали повреждения ДНК в клетках костного мозга и сперматогониях, постоянно претерпевающих митоз, в ходе которого разрушается ядерная мембрана. Поэтому хлорофиллин из цитоплазмы легко оказывался в их ядрах, где уже мог защитить их генетический аппарат.

А так как наибольшей радиочувствительностью обычно обладают именно быстроделющиеся клетки, хлорофиллин можно считать веществом, достойным дальнейшего изучения на предмет использования для нивелирования последний лучевого поражения.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

### Литература

1. Ильин Л.А., Рудный Н.М., Суворов Н.Н., Чернов Г.А., Антипов В.В., Васин М.В., Давыдов Б.И., Михайлов П.П. Индралин – радиопротектор экстренного действия. Противолучевые свойства, фармакология, механизм действия, клиника. Москва: Вторая типография Министерства здравоохранения Российской Федерации, 1994. – 436 с.
2. Singh V.K., Seed T.M. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome // Expert opinion on drug safety. 2019. Vol. 18(11). – P.: 1077–1090. doi: 10.1080/14740338.2019.1666104
3. Shivappa P., Bernhardt G.V. Natural Radioprotectors on Current and Future Perspectives: A Mini-Review // Journal of pharmacy & bioallied sciences. 2022. Vol. 14(2). – P.: 57–71. doi: 10.4103/jpbs.jpbs\_502\_21
4. Поздеев А.В., Лысенко Н.П. Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды // Известия Международной академии аграрного образования. 2018. Выпуск 42 (Т. 2). – С.: 60–62.
5. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo* // Biochimica et biophysica acta. 2004. Vol. 1672(2). – P.: 100–111. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
6. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M.C. *In vivo* effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells // Mutation research. 1994. Vol. 320(4). – P.: 329–334. doi: 10.1016/0165-1218(94)90085-x
7. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M.T. *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells // Mutation research. 1995. Vol. 344 (1-2). – P.: 73–78. doi: 10.1016/0165-1218(95)90041-1

## МАЛЫЕ ДОЗЫ РАДИАЦИИ И КОМПОНЕНТЫ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ КАК НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ СНИЖЕНИЯ РАДИОИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

*Д.В. Салеева<sup>1</sup>, Н.Ф. Раева<sup>1</sup>, Г.Д. Засухина<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА  
России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия  
dasha\_saleeva@inbox.ru

*Резюме.* В эксперименте были исследованы молекулярно-генетические показатели в различных органах мышей после 4х-кратного облучения в малых дозах (75 мГр). Показано, что в злокачественных тканях (Саркома Льюиса) преимущественно отмечалась активация онкогенов, тогда как в нормальных тканях (костный мозг, тимус и селезенка) превалировала активность онкосупрессоров, подавляющих рост опухолевых клеток. Полученные данные показывают защитный эффект малых доз радиации в нормальных тканях и его отсутствие в злокачественных клетках.

*Ключевые слова:* малые дозы радиации, онкогены, онкосупрессоры, злокачественные новообразования, тимохинон.

## LOW DOSES OF RADIATION AND COMPONENTS OF SOME PLANTS AS A NEW APPROACH TO REDUCE RADIO-INDUCED DNA DAMAGE

*D.V. Saleeva<sup>1</sup>, N.F. Raeva<sup>1</sup>, G.D. Zasukhina<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal  
Medical Biological Agency, Moscow, 123098, Russia

<sup>2</sup> The Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow,  
119991, Russia  
e-mail: dasha\_saleeva@inbox.ru

*Summary.* In the experiment, molecular genetic parameters in various organs of mice were studied after 4-fold irradiation in low doses (75 mGy). It was shown that oncogenes were mainly activated in malignant tissues (Lewis sarcoma), whereas in normal tissues (bone marrow, thymus and spleen), the activity of oncosuppressors that inhibit the growth of tumor cells prevailed. The obtained data show the protective effect of low doses of radiation in normal tissues and its absence in malignant cells.

*Keywords:* low doses of radiation, oncogenes, oncosuppressors, malignant neoplasms, thymoquinone.

Известно, что основным повреждающим компонентом действия радиации является окислительный стресс. В то же время эффекты действия малых доз радиации (МДР) характеризуются антиоксидантными свойствами, что является одним из главных факторов защитного механизма [1,2]. Было показано, что действие МДР стимулирует повышение уровня экспрессии онкосупрессоров, контролирующих защитные функции клеток, и ингибирует экспрессию онкогенов и ряда генов-мишеней, в том числе микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК) в нормальных клетках млекопитающих [3].

Радиопротекторными свойствами, подобно МДР, обладают компоненты некоторых растений. В последнее время повышенный интерес вызывает тимохинон (ТХ), компонент черного тмина (*Nigella sativa*), обладающий антиоксидантными или прооксидантными свойствами в зависимости от концентрации. ТХ способен стимулировать экспрессию ряда генов, обеспечивающих клеточный гомеостаз. Такое

действие способно приводить к снижению повреждающего действия вредных факторов, в частности ионизирующего излучения [4].

Если мышам вводили 50мг/кг ТХ внутривенно за 30 минут до облучения в дозе 5 Гр и затем ежедневно в течение 10 дней после облучения, то оксидативный стресс, измеряемый по параметрам понижения формирования оксида азота, уровня ксантинооксидазы и ряда других показателей, снижался, при этом нормальные клетки не повреждались [5]. Важно отметить, что протекторные свойства ТХ и других растительных компонентов оценивался по показателям активности ферментов оксидативного стресса [6].

**Целью исследования** явилось изучение активности генов и некодирующих РНК в различных органах мышей линии C57Bl/6 с трансплантированными опухолевыми клетками карциномы Льюиса, 4х-кратно облученных в малой дозе (0,075 Гр) с интервалом 4 дня.

**Материалы и методы:** Объектом исследования являлись 24 мыши-самки линии C57Bl/6, которым подкожно трансплантировали клетки карциномы Льюиса, а затем на 6, 10, 14, 18-е сутки после трансплантации облучали в дозе 0,075 Гр. Эвтаназию мышей путем декапитации осуществляли на 19-е сутки. После облучения в костном мозге, селезенке, тимусе и опухоли методом ПЦР-РВ определяли экспрессию генов и некодирующих РНК, которые по своим функциональным особенностям были разделены на онкосупрессоры (*P53*, *PTEN*, *P38*, *P1NT*, *DINO*, *Incp21*) и онкогены (*NFkB* (*p50*), *NFkB* (*p65*), *IAP-1*, *IAP-2*, *G-CSF*, *TNF $\alpha$* , *IkBa*, *iNOS*, *Cyclin E2*, *CTCF*, *TAL1*, *NEAT1*, *MALAT1*, *miR-21*). Результаты представляли в виде медианы изменения экспрессии показателей в группах облученных мышей, выраженных по отношению к медиане группы контроля, принятой за единицу. Для оценки статистической значимости применялся непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

### **Результаты**

Рост опухоли наблюдали в обеих группах мышей, однако в группе с облучением в малой дозе рост опухоли был в 1,25 раза ниже по сравнению с аналогичной группой без облучения. Профиль изученных генов и некодирующих РНК показал, что в группе «опухоль» отмечается преобладание в активации онкогенов во всех исследуемых органах мышей (64%, 57% и 57%, соответственно в костном мозге, селезенке и тимусе). В группе «Опухоль+облучение» количество инактивированных онкогенов превышало количество активированных в процентном соотношении (71/50 в костном мозге, 64/36 в селезенке, 64/36 в тимусе и 57/36 в опухоли). Кроме того увеличивалась экспрессия онкосупрессоров в костном мозге (33%), тимусе (83%) и селезенке (67%). В опухолевой ткани отмечалась активация всех исследуемых онкосупрессоров (100%) при воздействии ионизирующего излучения.

В эксперименте по исследованию влияния ТХ на экспрессию молекулярно-генетических показателей нами получены предварительные результаты об активации системы P53 в клетках головного мозга и селезенки мышей после введения препарата и облучения в дозе 6 Гр. Нами отмечены различия в чувствительности костного мозга, головного мозга и селезенки по активности исследуемого гена. Однако, необходимо проведение дополнительных экспериментов для более детального определения функции ТХ в клетках.

### **Обсуждение**

Из полученных данных следует, что наиболее чувствительными к действию МДР органами мышей с инокулированной опухолью по активации онкосупрессоров является тимус (83%), а по ингибированию онкогенов – костный мозг (71%). Таким образом, если в группе «Опухоль» активировались преимущественно онкогены, то в

группе мышей «Опухоль+облучение» преобладало подавление активности онкогенов и активация экспрессии онкосупрессоров в тимусе и опухоли.

Нами также проводятся исследования по радиопротекторному действию ТХ по показателям активности генов и некодирующих РНК у облученных мышей как до, так и после воздействия ионизирующего облучения. Эти данные позволят определить потенциал растительных антиоксидантов по сравнению с аналогичными свойствами МДР по показателям уровня экспрессии генов и их регуляторов. Из данных литературы известно, что и МДР и ТХ активируют иммунный статус организма, что позволяет использовать эти подходы в профилактических и терапевтических целях.

**Выводы.** Нами выявлены изменения активности генов и некодирующих РНК в тимусе, селезенке и костном мозге мышей после 4х-кратного облучения в малой дозе. Анализ представленных результатов позволяет сделать вывод о том, что МДР стимулируют иммунную систему мышей, что отражается в преобладании активности онкосупрессоров у облученных в МДР мышей с опухолью и сопровождается менее интенсивным ростом опухоли в этой группе. Полученные результаты показывают роль молекулярно-генетических структур (генов и некодирующих РНК) в реакциях, модулируемых ионизирующим излучением в малых дозах.

Таким образом, показано сохранение устойчивости нормальных клеток, облученных в МДР, что может расцениваться как проявление защитного действия МДР.

Эти данные могут быть использованы при радиотерапии опухолей, чувствительность которых не изменяется при облучении в малых дозах, однако проявляется протекторный эффект в отношении здоровых клеток, окружающих злокачественное новообразование.

#### **Список литературы**

1. Михайлов В.Ф., Засухина Г.Д. Новый подход к стимуляции защитных систем организма малыми дозами радиации. // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140 – № 3. – С. 244–252. doi: 10.31857/S0042132420030060.
2. Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Рождественский Л.М. и др. Активность генов и некодирующих РНК как подход к определению ранних биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей. Генетика. 2021; 57 (10); С. 1131-1140. 10.31857/S0016675821100076
3. Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Шулина Л.В. и др. Связь между динамикой роста перевивной карциномы Льюиса у мышей и изменением активности генов и некодирующих РНК после рентгеновского облучения в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 2022, 62(1), с. 28–41.
4. Hago S., Lu T., Alzain A.A., et al. Phytochemical constituents, *in-vitro* anticancer activity and computational studies of *Cymbopogon schoenanthus*. Nat Prod Res. 2023, 5:1-7. doi: 10.1080/14786419.2023.2208360.
5. Akyuz M., Taysi S., Baysal E., et al. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. Head Neck. 2017; 39(10):2027-2035. doi: 10.1002/hed.24861
6. Moshafi M.H., Torabizadeh S.A., Mohamadnezhad F., et al. Ferulago angulata as a Good Radioprotector Against Genotoxicity. Curr Radiopharm. 2022;15(2):110-116. doi: 10.2174/1874471014666210426111806.

## ВОЗДЕЙСТВИЕ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ И НУКЛЕОИДЫ ТАКИХ ЖЕ КЛЕТОК

*Н.П. Сирота*<sup>1</sup>, *В.А. Пикалов*<sup>2</sup>, *Е.Н. Смирнова*<sup>1</sup>, *О.М. Розанова*<sup>1</sup>, *Т.А. Белякова*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия

<sup>3</sup>Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева, Протвино, Россия

e-mail: [sirota@iteb.ru](mailto:sirota@iteb.ru)

*Резюме.* Проведена оценка первичных структурных повреждений в ДНК, после облучения ускоренными ионами углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в узком пике Брэгга. Облучению подвергались как клетки, так и нуклеоиды этих же клеток. Было проведено изучение экспрессии мРНК ряда генов в клетках АКЭ и ЕМРТ, облученных *in vivo*. Облучение живых клеток приводило к достоверному повышению уровня повреждений в первичной структуре ДНК при всех исследованных дозах, по сравнению с облученными в тех же дозах нуклеоидами.

*Ключевые слова:* ускоренные ионы углерода, нуклеоиды, АКЭ, ЕМРТ, узкий пик Брэгга

## IMPACT OF ACCELERATED CARBON IONS ON LIVING CELLS AND NUCLEOIDS OF THE SAME CELLS

*N.P. Sirota*<sup>1</sup>, *V.A. Pikalov*<sup>2</sup>, *E.N. Smirnova*<sup>1</sup>, *O.M. Rozanova*<sup>1</sup>, *T.A. Belyakova*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> A.A. Logunov National Research Center “Kurchatov Institute”, Protvino, Russia

<sup>3</sup> Physical-Technical Center of the Physical Institute, P.N. Lebedeva, Protvino, Russia  
e-mail: [sirota@iteb.ru](mailto:sirota@iteb.ru)

*Summary.* Primary structural damage in DNA was assessed after irradiation with accelerated carbon ions with energy of 450 MeV/nucleon in a narrow Bragg peak. Both cells and nucleotides of the same cells were exposed to radiation. The mRNA expression of a number of genes in AKE and EMPT cells irradiated *in vivo* was studied. Irradiation of living cells led to a significant increase in the level of damage in the primary DNA structure at all doses studied, compared with nucleotides irradiated at the same doses

*Keywords:* accelerated carbon ions, nucleotides, AEC, EMPT, narrow Bragg peak

Основной мишенью при действии излучений на клетки является молекула ядерной ДНК. ДНК-повреждающие эффекты можно оценивать различными методами. В связи с особенностями физического взаимодействия ускоренных ионов с биологическими объектами и технической спецификой ускорителей, существует необходимость адаптации хорошо известных и более современных молекулярных методов для определения повреждений ДНК при действии ускоренных ионов углерода. Ускоренные ионы рассматриваются в мире как перспективный метод для радиотерапии онкологических заболеваний. В России на базе ускорительных научных центров созданы экспериментальные установки для проведения тестовых испытаний. Одна из

них «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» в г. Протвино на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ. Эта установка предназначена для исследований на ускоренных ионах углерода в диапазоне энергий 150-450 МэВ/нуклон. В исследованиях противоопухолевого действия ионов углерода используют четыре режима облучения: до и после пика Брэгга, а также в узком и модифицированном (расширенном) пике Брэгга. С нашей точки зрения, для целей ионной радиотерапии наиболее перспективным является использование узкого пика Брэгга, который обладает по сравнению с расширенным пиком большей линейной потерей энергии, что обуславливает его более высокую биологическую эффективность. В узком пике Брэгга происходит максимальная потеря энергии ускоренными ионами углерода, и самое важное – ширина пика Брэгга не превышает 2 мм, что позволяет точнее облучать мишень. Оборудование установки позволяет использовать все режимы облучений. Измерение дозы при облучении проводилось с помощью плоскопараллельной ионизационной камеры, откалиброванной по показаниям клинического дозиметра UNIDOS webline (PTW Freiburg, Германия) с ионизационной камерой Farmer 30013.

Целью работы было провести сравнительное исследование ответа клеток и их нуклеоидов на воздействие ускоренных ионов углерода при одновременном облучении в узком пике Брэгга. Важно подчеркнуть, что облучению в одном и том же сеансе подвергались как препараты для исследований методом Comet assay, так и клетки асцитной карциномы Эрлиха и ЕМРТ, используемые для выделения тотальной РНК с последующей оценкой уровней экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. Препараты для исследований методом Comet assay готовились в двух вариантах: клетки на препаратах первой группы подвергались процедуре лизиса немедленно после приготовления препаратов и хранились до момента облучения согласно разработанной нами процедуре; вторая группа препаратов представляла собой живые клетки, иммобилизованные в легкоплавкую агарозу. Эти препараты готовили в день облучения, помещали в среду RPMI1640 и хранили в ней до момента облучения ускоренными ионами углерода. Для одновременного облучения препаратов из обеих групп мы разработали и изготовили специальные держатели, которые полностью вписывались в поле облучения ускоренными ионами углерода. Размер этого поля представлял собой круг диаметром 6 см. Равномерность облучения в пределах всего поля составляла не хуже 95%. В верхнем ряду держателя располагали 4 препарата с нуклеоидами, а в нижнем ряду находились 4 препарата с живыми опухолевыми клетками. Сформированный таким образом объект помещали в водный фантом с прецизионной 3D-системой перемещения. В узком пике Брэгга была выполнена серия облучений дозами 2, 4 и 8 Гр. Измерение дозы при облучении проводилось с помощью плоскопараллельной ионизационной камеры, откалиброванной по показаниям клинического дозиметра UNIDOS webline (PTW Freiburg, Германия) с ионизационной камерой Farmer 30013.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что первичные ДНК-повреждения более сильно выражены при облучении живых клеток по сравнению с реакцией в нуклеоидах тех же клеток. Интересно отметить, что на препаратах с нуклеоидами, облученными аналогичными дозами рентгеновского излучения, с увеличением дозы не регистрировалось достоверного превышения уровня %TDNA (содержание ДНК в хвосте кометы, которое характеризует степень повреждения), по сравнению с облучением ускоренными ионами углерода. Полученные результаты, возможно, отражают специфику действия ионов углерода на ДНК клетки, поскольку известно, что при действии ускоренных частиц образуются сложные кластерные повреждения ДНК, по структуре отличающиеся от таковых при действии фотонного излучения. Облучение живых клеток приводило к достоверному повышению уровня



повреждений в первичной структуре ДНК при всех исследованных дозах. Мы полагаем, что это различие связано с функционированием внутриклеточных систем контроля целостности структуры ДНК. Облучение ускоренными ионами углерода осадка клеток под раствором жидкости (в эппендорфах) сопровождается уменьшением количества экстрагируемой тотальной РНК с увеличением дозы облучения. Этот эффект наблюдается как для клеток ЕМРТ так и для АКЕ. Для того чтобы оценить влияние облучения на экспрессию интересующих нас генов мы провели синтез кДНК для всех полученных образцов тотальной РНК. Количество РНК используемое в реакции было порядка 1-2 мкг

Количество кДНК синтезированной на общей РНК для гена *gapdh* не различается для всех исследованных образцов ( $St = 17,7 \pm 0,6$ ), за исключением образца №4 . В этом образце значение  $St$  отличается на целый цикл ( $St = 18,7$ ) . Из чего можно сделать вывод, что количество кДНК присутствующее в этом образце в два раза меньше чем в других исследованных образцах. Количество кДНК синтезированной на тотальной мРНК для генов *baх* и *cdk1a* сопоставимо между собой ( $St = 25,8 \pm 0,7$  и  $26 \pm 0,4$ ) и не изменяется с дозой облучения в клетках Емрт. Аналогичный вывод можно сделать и для клеток АКЕ. Экспрессия гена *bbs3* существенно снижена в обоих типах клеток ( $St = 30,5 \pm 0,5$ ). Эффекта облучения на экспрессию мРНК этого гена также не наблюдается.

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ДОЗ ПРОТОНОВ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ  
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ *EX VIVO* НА ИНДУКЦИЮ  
СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ**

*Н.С. Стрельникова<sup>1</sup>, О.М. Розанова<sup>2</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>2</sup>, Т.А. Белякова<sup>1</sup>,  
А.В. Смирнов<sup>1</sup>, А.Е. Шемяков<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Филиал “Физико-технический центр” Физического института  
им. П. Н. Лебедева РАН, Протвино, Российская Федерация

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино,  
Российская Федерация  
e-mail: [strelnikova.ns@lebedev.ru](mailto:strelnikova.ns@lebedev.ru)

Изучены закономерности индукции солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей в короткие и отдаленные сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* высокими дозами протонов. Скорость роста солидной опухоли после инокуляции облученных клеток *ex vivo* совпала с ростом опухолей контрольной группы. Частота индукции опухолей у мышей с перевитыми клетками АКЭ была дозозависимой и уменьшалась с 80% до 0% с ростом дозы.

*Ключевые слова:* асцитная карцинома Эрлиха, протоны, *ex vivo*, рост опухоли, мыши

**INFLUENCE OF HIGH DOSES OF PROTONS ON EHRlich ASCITOUS  
CARCINOMA CELLS UNDER *EX VIVO* IRRADIATION ON THE INDUCTION OF  
SOLID TUMORS IN MICE**

*N.S. Strelnikova<sup>1</sup>, O.M. Rozanova<sup>2</sup>, E.N. Smirnova<sup>2</sup>, T.A. Belyakova<sup>1</sup>, A.V. Smirnov<sup>1</sup>,  
A.E. Shemyakov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Branch “Physical Technical Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the  
Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of  
Sciences, Pushchino, Russian Federation  
e-mail: [strelnikova.ns@lebedev.ru](mailto:strelnikova.ns@lebedev.ru)

The patterns of induction of the solid form of Ehrlich's ascitic carcinoma (EAC) in mice were studied in the short and long-term periods after inoculation of ascitic cells irradiated *ex vivo* with high doses of protons. The growth rate of solid tumors after inoculation of irradiated cells *ex vivo* coincided with the growth of tumors in the control group. The frequency of tumor induction in mice transplanted with EAC cells was dose-dependent and decreased from 80% to 0% with increasing dose.

*Keywords:* Ehrlich ascites carcinoma, protons, *ex vivo*, tumor growth, mice

Введение. Протонная терапия (ПТ) является современным, активно развивающимся методом лучевой терапии. Использование технологии тонкого сканирующего пучка обеспечивает точную выгрузку дозы в опухоли, максимально снижая повреждение окружающих тканей. В настоящее время идет поиск путей дальнейшего повышения эффективности ПТ с помощью гипофракционирования, наноэхансергов и флэш-терапии. Наблюдается хорошее совпадение литературных данных при определении величины относительной биологической эффективности протонов, полученных *in vivo* и *in vitro* [1] и можно предположить, что эксперименты *ex vivo* могут служить удобной и полезной моделью на этапе подбора доз, режимов облучения, способов модификации воздействия для дальнейшего изучения молекулярно-генетических повреждений и механизмов, которые участвуют в

реализации противоопухолевого действия протонов. Другой важной проблемой современной радиационной генетики является изучение новых способов воздействия на причины рецидивирования опухолей. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность однократного облучения протонами в высоких дозах 30–80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту ее рецидивирования [2]. В настоящее время критическим компонентом в возникновении, росте, метастазировании и рецидивировании опухолей считают небольшой пул (0.01–4%) опухолевых стволовых клеток (ОСК) [3], которые проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии и радиотерапии. Из-за сложности идентификации и выделения ОСК существует очень мало данных о закономерностях действия излучений с разными значениями ЛПЭ на возникновение и репарацию повреждений ДНК, индукцию деления, клеточной дифференцировки и гибели этих клеток. Еще меньше известно о влиянии и участии различных регуляторных молекул, сигнальных путей, микроокружения опухоли, которые запускают процессы рецидивирования. В связи с этим также существует необходимость разработки экспериментальных подходов, которые бы позволяли исследовать эти процессы в условиях, когда происходит полная гибель опухолевых и нормальных клеток, формирующих опухоль, но с учетом влияния иммунитета организма и сохранения факторов микроокружения опухоли.

Целью данной работы являлось изучение скорости роста и частоты индукции солидной формы АКЭ у мышей в короткие и отдаленные сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов в диапазоне доз 30–150 Гр.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей колонии SHK (30–34 г), которых содержали в стандартных условиях вивария [4]. В качестве модели опухоли была использована асцитная форма АКЭ. Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной перевивки. Выделенные опухолевые клетки ресуспендировали в физрастворе до концентрации  $20 \times 10^6$  клеток/мл и помещали в эппендорфы объемом 1.5 мл.

Облучение клеток протонами (~100 МэВ) в модифицированном пике Брэгга проводили методом сканирования по заданному объему в дозах 30–150 Гр на синхротроне комплекса ПТ ФТЦ ФИАН (Протвино). После облучения экспериментальным и контрольным мышам внутримышечно вводили  $2 \times 10^6$  клеток АКЭ в бедро левой лапы. В каждой группе было 10 мышей. Далее наблюдали за частотой индукции солидных опухолей и скоростью их роста. Для статистической оценки значимости различий применяли t-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически не значимыми при  $p \leq 0.05$ .

Результаты исследований. В контрольной группе у всех мышей, которым были введены необлученные клетки, индуцировалась солидная опухоль, пальпируемая на 5-е сут (~0.4 см<sup>3</sup>), через 35 сут она достигала стандартного для этой модели объема ~7.5 см<sup>3</sup>. В группах мышей, которым были инокулированы облученные клетки, наблюдали появление опухолей у отдельных животных с задержками начала роста АКЭ.

После появления опухолевого узла в месте инокуляции облученных клеток определяли скорость роста опухоли по среднему времени пятикратного увеличения опухоли. Этот показатель в группах не зависел от дозы и составил  $13.5 \pm 4.8$  дня, что достоверно не отличалось от контрольной группы, где он был равен  $12.5 \pm 3.5$  дня. Возможно, что к моменту начала роста опухоли, выжившие ОСК, преодолев иммунный контроль организма, дифференцировались и пролиферировали до стартового количества опухолевых клеток, который необходим для индукции роста АКЭ с той же скоростью.

Появление опухолей наблюдалось в первые два месяца после облучения, а далее количество опухолей не изменялось до конца жизни экспериментальных животных. Таким образом, мы выявили критический период времени после инокуляции облученных *ex vivo* опухолевых клеток, в течение которого возникают опухоли, причем длительность этого интервала не зависела от дозы в отличие от частоты индукции. Ранее нами при облучении солидной АКЭ у мышей *in vivo* однократно в дозах 60 и 80 Гр после полного подавления первичного опухолевого узла возобновление роста опухолей той же локализации начинали фиксировать на 5 неделе, а самые поздние рецидивы возникали даже через 8 месяцев после облучения [2]. Мы предполагаем, что при использовании данной модели после облучения суспензии *ex vivo* в сублетальных и летальных дозах протонов с последующей инкубацией в условиях функционирования нормального иммунитета организма происходит гибель дифференцированных опухолевых клеток, и появление опухолей можно рассматривать как индукцию рецидивов. Опухоли возникали в той же локализации, динамика их роста совпадала с таковой после инокуляции 2 млн необлученных клеток. Появление рецидивов после облучения клеток *ex vivo* в сверхвысоких дозах подтверждает предположение, высказанное в работах других авторов о ключевой роли ОСК в рецидивировании после лучевой терапии и их радиорезистентности [5].

Заключение. Используя в нашей работе однократно экстремально высокие для выживаемости клеток дозы, равные величине суммарной дозы при радиотерапии, мы попытались оценить на модели облучения клеток АКЭ *ex vivo* достаточную дозу, при которой происходит не только полная гибель клеток опухоли, но и ингибирование сигнальных факторов и процессов, которые инициируют дифференцировку ОСК в опухолевые или их репопуляцию. Полученные нами закономерности влияния высоких доз протонов на опухолевые клетки могут послужить основой для дальнейшего изучения ключевых молекулярных механизмов и роли каждого из них в канцерогенезе для дальнейшего совершенствования ПТ.

#### Список литературы

1. Hirayama R., Uzawa A., Obara M., et al. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;793:41–47.
2. Балакин В.Е., Белякова Т.А., Розанова О.М., и др. *Биомедицина*. 2021;17(3E):127–132.
3. Yin W., Wang J., Jiang L., Kang J. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021;246(16):1791–1801.
4. Smith J.A., van den Broek F.A.R., Martorell J.C., et al. *Lab Anim*. 2007;41(2):143–160.
5. Yang L., Shi P., Zhao G., et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):8.

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ  
АУТОФАГИИ С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ  
В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ РАБОТНИКОВ ОБЪЕКТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*Р.М. Тахауов<sup>1,3</sup>, Д.С. Исубакова<sup>1</sup>, О.С. Цымбал<sup>1</sup>,*

*Н.В. Литвяков<sup>1,2</sup>, М.Ю. Цыпленкова<sup>1</sup>, И.В. Мильто<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

e-mail: [mail@sbrc.seversk.ru](mailto:mail@sbrc.seversk.ru)

*Резюме.* Представлены результаты изучения связи однонуклеотидных полиморфизмов генов аутофагии с повышенной частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения, подвергавшихся в ходе профессиональной деятельности длительному радиационному воздействию в дозах 100-500 мЗв. Установлена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма гена *ATG10 rs2897554* с высокой частотой дигцентрических хромосом в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения; для остальных изученных типов хромосомных aberrаций ассоциация с однонуклеотидными полиморфизмами исследованных генов аутофагии статистически не подтверждена.

*Ключевые слова:* ионизирующее излучение, хромосомные aberrации, однонуклеотидный полиморфизм.

**STUDY THE RELATIONSHIP OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS  
OF AUTOPHAGY GENES WITH AN INCREASED FREQUENCY OF  
CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BLOOD LYMPHOCYTES OF EMPLOYEES  
OF THE IONIZING RADIATION FACILITY**

*R.M. Takhaouov<sup>1,3</sup>, D.S. Isubakova<sup>1</sup>, O.S. Tsybmal<sup>1</sup>,*

*N.V. Litviakov<sup>1,2</sup>, M.Yu. Tsyplenkova<sup>1</sup>, I.V. Milto<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia

<sup>2</sup>Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

<sup>3</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

*Summary.* The results of studying the relationship of single-nucleotide polymorphisms of autophagy genes with an increased frequency of cytogenetic disorders in the blood lymphocytes of workers of the ionizing radiation facility exposed to prolonged radiation exposure at doses of 100-500 mSv are presented. The association of single-nucleotide polymorphism *rs2897554* of the *ATG10* gene with a high frequency of dicentric chromosomes in blood lymphocytes was established, all other types of cytogenetic disorders did not show statistical significance.

*Key words:* ionizing radiation; chromosomal aberrations; single nucleotide polymorphism.

Аутофагия способствует поддержанию гомеостаза клетки, в т. ч. в ответ на стресс, например, при нехватке питательных веществ. Дефект механизмов аутофагии приводит к денатурации белков, повреждению митохондрий и повышенному

образованию активных форм кислорода, вызывающих повреждение ДНК. Нарушение механизмов аутофагии играют роль в развитии онкологических и др. заболеваний. Помимо этого, аутофагия лежит в основе особой формы программируемой клеточной гибели – аутофагической гибели, являющейся важным механизмом элиминации повреждённых клеток. Аутофагическая гибель может быть индуцирована ионизирующим излучением (ИИ), активными формами кислорода и некоторыми противоопухолевыми препаратами [1]. Так, например, Алессиво с соавт. показали, что облучение мезенхимных стволовых клеток в дозе 40 мГр приводило к снижению интенсивности аутофагии и индукции клеточного старения через 6-48 часов после облучения [2].

Цель исследования – оценить связь однонуклеотдных полиморфизмов (ОНП) генов аутофагии с повышенной частотой хромосомных aberrаций (ХА), возникших у работников объекта использования ионизирующего излучения (ОИИИ) под действием долговременного техногенного профессионального облучения ИИ в диапазоне доз 100-500 мЗв.

### **Материал и методы**

Объектом исследования служила кровь 319 условно здоровых работников ОИИИ, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному внешнему облучению  $\gamma$ -излучением в дозах 100-500 мЗв, и 77 условно здоровых работников ОИИИ, не подвергавшихся облучению ИИ. Для всех обследованных лиц проводили стандартный цитогенетический анализ мононуклеарных лейкоцитов крови. ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия). Генотипировали ДНК по 164 ОНП генов аутофагии с помощью ДНК-чипов высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США). Затем выявленные ОНП генотипировали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, США). Анализ данных генотипирования проводили по рецессивной модели, которая выбрана согласно информационному критерию Акаике. При анализе данных генотипирования исключены ОНП любого генотипа при  $p < 5$ . Соответствие распределения генотипов в выборке равновесию Харди – Вайнберга оценивали с помощью программы Court lab HW calculator в формате Excel. Для установления значимости различий между выборками по частоте ХА применяли критерий Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ).

### **Результаты**

На первом этапе с помощью ДНК-чипов провели исследование ассоциации 164 ОНП генов аутофагии с высокой частотой ХА у персонала ОИИИ (95 человек), подвергавшегося облучению ИИ: медиана дозы – 181,50 мЗв, интерквартильный размах – 151,22-289,36 мЗв. В результате из 164 ОНП в окончательный статистический анализ включили 41 ОНП. Затем выполнили оценку ассоциации повышенной частоты радиационно-индуцированных ХА в зависимости от ОНП исследованных генов аутофагии. Ассоциация с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом установлена для 4 ОНП генов аутофагии.

На втором этапе проводили валидацию выявленных 4 ОНП. Материалом служила кровь 224 работников ОИИИ, подвергавшихся облучению ИИ (медиана дозы – 207,81 мЗв, интерквартильный размах – 150,80-332,74 мЗв), а также контрольная группа работников ОИИИ, не подвергавшихся радиационному воздействию ( $n = 77$ ).

Ассоциация с высокой частотой дицентрических хромосом установлена для 1 ОНП *ATG10 rs2897554*. Для других типов ХА не установлено статистически значимых показателей с проанализированными ОНП генов аутофагии. Контрольная группа не показала ассоциаций с повышенной частотой ЦН.

## Обсуждение

Ген *ATG10* играет важную роль в инвазии и пролиферации опухолевых клеток (рак легкого, толстой кишки, желудка, молочной железы, колоректальный рак и др.) [3-6]. Считается, что дефицит аутофагии способствует патогенности многих заболеваний, включая нейродегенеративные заболевания, заболевания печени и старение, а также бактериальные инфекции [7].

ОНП гена *ATG10 rs2897554* является интронным и располагается в позиции chr5:81980422 (GRCh38.p14). Литературные данные о вкладе этого ОНП в регуляцию функциональной активности *ATG10* отсутствуют.

Нами выявлено, что для ОНП *ATG10 rs2897554* носители рецессивного генотипа имели частоту дицентрических хромосом в 1,7 раза выше по сравнению с носителями доминантного генотипа при относительно одинаковых дозах внешнего облучения ИИ.

## Выводы

В результате проведенного исследования выявлен ОНП гена *ATG10 rs2897554*, который может рассматриваться в качестве потенциального маркера для включения в панель для экспресс-оценки уровня индивидуальной радиочувствительности человека. Для работников ОИИИ показано, что рецессивный генотип *rs2897554* ассоциирован с повышенной частотой дицентрических хромосом при хроническом профессиональном облучении ИИ в диапазоне доз 100-500 мЗв.

## Список литературы

1. Погодина Е.С. Анализ радиационно-индуцированной динамики транскриптома радиорезистентных и радиочувствительных опухолевых клеток. Дис. ... канд. биол. наук. Ульяновск, 2017. С. 117.
2. Alessio N. et al. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. № 10. P. 8155–8166. DOI: 10.18632/oncotarget.2692.
3. White E. The role for autophagy in cancer // *J Clin Invest*. 2015. Vol. 125. No. 1. pp. 42-46. DOI: 10.1172/JCI73941.
4. Jo Y.K. et al. Increased expression of ATG10 in colorectal cancer is associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. No. 12. P. e52705. DOI: 10.1371/journal.pone.0052705.
5. Xie K. et al. Role of ATG10 expression quantitative trait loci in non-small cell lung cancer survival // *Int J Cancer*. 2016. Vol. 139. No. 7. pp. 1564-1573. DOI: 10.1002/ijc.30205.
6. Li F. et al. ATG10 overexpression is related to the dismal prognosis and promotes the growth and migration of hepatocellular carcinoma cells via cyclin B1/CDK1 and CDK2 // *Am J Cancer Res*. 2023. Vol. 13. No. 4. pp. 1188-1208.
7. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease // *Cell*. 2008. Vol. 132. No. 1. pp. 27-42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОБОЧНОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ**

*И.К. Хвостунов, В.В. Крылов, Т.Ю. Кочетова, О.Н. Коровчук, А.С. Жиронкина, С.Н. Корякин, С.А. Иванов*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия  
e-mail: igor.khvestunov@gmail.com

*Резюме.* Путем цитогенетического обследования онкологических пациентов выполнена сравнительная оценка побочного радиационного воздействия четырех различных радиофармпрепаратов (РФЛП). Показана перспективность анализа прироста индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови после введения РФЛП в качестве оценки указанного воздействия. Продолжение подобных исследований при выборе различных видов РФЛП даст возможность получить сравнительную оценку их безопасности и эффективности с целью дальнейшего совершенствования критериев назначения радионуклидной терапии.

*Ключевые слова:* радионуклидная терапия, радиофармпрепарат, побочное радиационное воздействие, цитогенетическое обследование, лимфоциты крови.

## **COMPARATIVE ASSESSMENT OF SIDE RADIATION EFFECT DURING THERAPY OF CANCER PATIENTS USING VARIOUS RADIOPHARMACEUTICALS**

*I.K. Khvestunov, V.V. Krylov, T.Yu. Kochetova, O.N. Korovchuk, A.S. Zhironkina, S.N. Koryakin, S.A. Ivanov*

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Obninsk, Kaluga Region, Russia  
e-mail: igor.khvestunov@gmail.com

*Summary.* By means of a cytogenetic examination of cancer patients, a comparative assessment of the side radiation effects of four different radiopharmaceuticals (RFLP) was performed. The analysis of the increase in induced chromosomal aberrations in blood lymphocytes after the administration of RFLP is shown to be promising as an assessment of this effect. The continuation of such studies when choosing different types of RFLP will provide an opportunity to obtain a comparative assessment of their safety and effectiveness in order to further improve the criteria for prescribing radionuclide therapy.

*Key words:* radionuclide therapy, radiopharmaceutical, side effects of radiation, cytogenetic examination, blood lymphocytes.

При радионуклидной терапии (РНТ) используются различные радиофармпрепараты (РФЛП), предназначенные для терапии таких заболеваний как рак щитовидной или предстательной железы, лимфомы, а также метастазы в кости. В таком случае облучению подвергается непосредственно сама опухоль, что направленно на излечение, облегчение состояния или подавление роста опухоли и метастаз. РФЛП вводят в целевые патологические области, однако он воздействует и на здоровые органы и ткани, что отмечается как неблагоприятное побочное радиационное воздействие. Таким образом, соотношение пользы и риска от РФЛП по-прежнему остается актуальным предметом исследования [1].



Целью настоящей работы являлась сопоставительная оценка побочного радиационного воздействия различных РФЛП на организм онкологических пациентов путем анализа индуцированных хромосомных повреждений в лимфоцитах периферической крови.

В работе были обследованы четыре группы онкологических пациентов, проходившие лечение по поводу различных форм рака в отделении открытых радионуклидов МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Пациенты I группы (10 муж. и 50 жен., возраст 1.6 - 72 года) получали послеоперационную радиойодтерапию натрия йодид,  $^{131}\text{I}$  ( $\beta$ -излучение 8.06 МэВ) по поводу дифференцированного рака щитовидной железы с разовым пероральным введением в пределах 0.55 – 5.0 ГБк. Во II группе (19 муж., возраст 58 - 75 лет) пациенты получали терапию препаратом «Лютапрост – МРНЦ»,  $^{177}\text{Lu}$  ( $\beta$ -излучение 497 кэВ) по поводу рака предстательной железы с разовым инъекционным введением в пределах 5 – 7.5 ГБк. Пациенты III группы (5 муж. и 6 жен., возраст 57 - 80 лет) получали паллиативную терапию препаратом самарий-оксабифор,  $^{153}\text{Sm-EDMP}$  ( $\beta$ -излучение 233 кэВ) по поводу наличия метастаз в костях с разовым инъекционным введением в пределах 1.1 – 1.7 ГБк. В IV группе (32 муж., возраст 52 - 76 лет) пациенты получали паллиативную терапию препаратом радия дихлорид (КСОФИГО)  $^{223}\text{Ra}$  ( $\alpha$ -излучение 5 – 7.5 МэВ,) по поводу наличия метастаз в костях с разовым инъекционным введением в пределах 3.3 – 5.5 ГБк. Для цитогенетического анализа использовали образцы периферической крови, взятые из локтевой вены до начала терапии и повторно после выхода пациента из закрытой зоны, 3-4 дня (I-II группа), при повторном поступлении через 1 месяц (III-IV группы). Образцы крови у всех обследованных лиц брались в соответствии с действующим законодательством РФ и нормами медицинской этики после получения информированного согласия. Хромосомные aberrации изучались метафазным методом в клетках первого митоза по стандартной методике. Приготовление препаратов и фиксацию клеток выполняли в соответствии с международными рекомендациями МАГАТЭ [2]. Анализировали aberrации хромосомного типа: ацентрики (ace: парные фрагменты и точки), центрические кольца (rc) и дицентрики (dic).

В качестве показателя радиационного воздействия использовали среднюю величину суммы aberrаций  $M(\text{ace}+\text{rc}+\text{dic})/100$  клеток со стандартной ошибкой среднего (SE). Был проанализирован прирост среднего, т.е. разность частот aberrаций после и до терапии РФЛП. Наряду с суммарной частотой, анализировали спектр хромосомных aberrаций, детектированных в различных группах в сопоставлении с результатами обследования контрольных групп. Рассматривали по отдельности результаты до и после терапии. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных методов, реализованных в программных средствах Microsoft Excel и OriginLab-6.0.

Результаты обследования онкологических пациентов в четырех группах были сопоставлены с полученными ранее в лаборатории радиационной цитогенетики результатами обследования здоровых доноров:  $0.25 \pm 0.01$  [3] и онкологических пациентов без радиационного воздействия:  $0.48 \pm 0.07$  [4]. Прирост частоты aberrаций в группах составил: в I -  $4.21 \pm 0.31$ ; во II -  $6.03 \pm 1.00$ ; в III -  $2.42 \pm 0.71$ ; в IV -  $4.42 \pm 0.51$ . Таким образом, по критерию прироста частоты aberrаций побочное радиационное воздействие в группе II ( $^{177}\text{Lu}$ ) оказалось в 1.4 раза выше по сравнению с группой I ( $^{131}\text{I}$ ), а в группе IV ( $^{223}\text{Ra}$ ) в 1.8 раза выше по сравнению с группой III ( $^{153}\text{Sm}$ ) при сопоставимых промежутка времени между последовательными заборами крови у пациентов. В целом, максимальный прирост наблюдался в группе II ( $^{177}\text{Lu}$ ), а минимальный в группе III ( $^{153}\text{Sm}$ ).

Спектральный анализ aberrаций показал, что прирост общей частоты происходит во всех группах не только за счет традиционных радиационных маркеров, дипентриков и центрических колец, но также и за счет ацентрических фрагментов. Принято считать, что последние обладают меньшей специфичностью к радиационному воздействию, однако они также могут быть использованы для биологической дозиметрии с целью повышения статистической точности оценки поглощенной дозы.

В результате было показано, что частоты радиационных маркеров как до, так и после введения РФЛП во всех группах превышают спонтанный уровень, что является объективным индикатором предшествующего радиационного воздействия. При сопоставимых промежутка времени между заборами крови побочное воздействие РФЛП «Лютাপрост-МРНЦ» в 1.4 раз выше по сравнению с РФЛП натрия йодид, а побочное воздействие РФЛП радия дихлорид (КСОФИГО) в 1.8 раз выше по сравнению с РФЛП самарий-оксабифор. Продолжение подобных исследований при выборе различных видов РФЛП даст возможность получить более точную сравнительную оценку их безопасности и эффективности с целью дальнейшего совершенствования критериев назначения РНТ.

### **Литература.**

1. Van Nostrand, D. The benefits and risks of I-131 therapy in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid*.2009. V. 19. N 12. P. 1381–1391. doi: 10.1089/thy.2009.1611.
2. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: A Manual - (Technical Reports Series/ IAEA; № 405) / International Atomic Energy Agency.-Vienna: IAEA, 2001.-127 p.
3. Севанькаев А.В., Хвостунов И.К., Снигирёва Г.П. и др. Сравнительный анализ результатов цитогенетических обследований контрольных групп лиц в различных отечественных лабораториях // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2013. - Т. 53. № 1. - С. 5–24. DOI: 10.7868/S0869803112060124
4. Khvostunov I.K., Saenko V.A., Krylov V.V., Rodichev A.A., Yamashita S. Cytogenetic biodosimetry and dose-rate effect after radioiodine therapy for thyroid cancer // *Radiation and Environmental Biophysics*. 2017. V 56. N 3. P. 213–226. DOI: 10.1007/s00411-017-0696-3.

## ПЕРЕНОС ЗАРЯДА И КВАНТОВОЙ ИНФОРМАЦИИ В ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

*А.В. Чижов<sup>1</sup>, Д. Чевизович<sup>2</sup>, С.Э. Ширмовский<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>2</sup>Институт ядерных наук «Винча», Белград, Сербия

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия  
e-mail: chizhov@jinr.ru

*Резюме.* В работе проведено описание процессов переноса заряда в биомолекулах, таких как ДНК, а также в белках и РНК, возникающих при действии ионизирующих излучений. Исследование выполнено на основе поляронного подхода и уравнения Шрёдингера с диссипативной правой частью. Проанализирована природа динамики поляронных состояний заряженной частицы, мигрирующей по цепи ДНК. Исследованы квантовые корреляции между структурными элементами макромолекулярной цепи с учетом её основных системных параметров и влияния температуры окружения.

*Ключевые слова:* биомолекулы, полярон, квантовые корреляции

## TRANSFER OF CHARGE AND QUANTUM INFORMATION IN DNA UNDER THE ACTION OF IONIZING RADIATION

*A.V. Chizhov<sup>1</sup>, D. Chevizovich<sup>2</sup>, S.Eh. Shirmovsky<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>2</sup>Vinča Institute for Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Far-East Federal University, Vladivostok, Russia  
e-mail: chizhov@jinr.ru

*Summary.* The paper describes the processes of charge transfer in biomolecules, such as DNA, as well as in proteins and RNA, arising from the action of ionizing radiation. The study was carried out on the basis of the polar approach and the Schrödinger equation with a dissipative right-hand side. The nature of the dynamics of polaronic states of a charged particle migrating along the DNA chain, is analyzed. Quantum correlations between the structural elements of a macromolecular chain are investigated, taking into account its main system parameters and the influence of ambient temperature.

*Key words:* biomolecules, polaron, quantum correlations

Учёт процессов переноса заряда и энергии в ДНК, а также в РНК и белках, является важным при рассмотрении эффектов воздействия ионизирующих излучений на живые организмы. Миграция заряда в ДНК напрямую связана с её повреждением, что может снизить точность репликации молекулы ДНК и, следовательно, может стать источником геномных мутаций. Кроме того, биомолекулы являются ресурсом нанобиотехнологий, обеспечивая миниатюризацию микроэлектронных устройств. Молекулы ДНК и различные биополимеры являются перспективными биоструктурами для записи и хранения информации, что важно для создания молекулярных и квантовых компьютеров.

Целью работы явилось изучение динамики переноса заряда и энергии в биомолекулах на квантово-механическом уровне и возникающих при этом квантовых

корреляций между структурными элементами макромолекулярной цепи с учетом её основных системных параметров и влияния температуры окружения.

Для описания транспортных процессов в биомолекулах в работе предложено два подхода. Первый – это квантово-механический подход, основанный на концепции поляронных состояний как результат взаимодействия зарядовых или вибронных состояний молекулярной цепочки с её деформационными возбуждениями [1]. Благодаря такому взаимодействию заряда с фононами может происходить самозахват заряда и возникает эффект полярона. Такие квазичастицы могут распространяться на большие расстояния в солитонной форме с минимальными потерями энергии. Влияние температуры окружения на транспортные процессы учитывался в рамках приближения среднего поля.

Для исследования переноса заряда в ДНК использовался так же квантово-механический подход, основанный на уравнении Шрёдингера с диссипативной правой частью. Подход развит на основе геликоидальной модели Пейрарда–Бишопа. В этом случае заряд рассматривается как квантовая квазичастица, которая подчиняется квантовой динамике. ДНК представляется как классический объект, подчиняющийся уравнениям Гамильтона [2].

Описание процессов переноса в высокомолекулярных структурах на квантово-механическом уровне дало возможность исследовать возникающие в таких системах квантовые корреляции [3,4]. Так, в частности, в работе [4] было показано, что скорость миграции запутанного состояния в микротрубочке клетки сравнима со скоростью передачи нервных импульсов. Кроме того, в настоящее время считается, что квантовые корреляции и запутанность между электронными состояниями нуклеиновых кислот в ДНК могут быть ответственны за процессы её репарации и репликации. Для описания таких корреляций в работе применяются методы, основанные на квантовых корреляционных функциях, а также на мере запутанности в виде логарифмической отрицательности

Список литературы:

- [1] D. Chevzovich, S. Zdravkovic, A.V. Chizhov, Z. Ivic. Chinese Physics B. 2023. V. 32. № 1. P. 010506-11.
- [2] S. Eh. Shirmovsky. Biophys. Chem. 2016. V. 217, P. 42–57.
- [3] AV. Chizhov. Quantum Correlation Effects in Biopolymer Structures. In: Nonlinear Dynamics of Nanobiophysics (Editors: S. Zdravkovic, D. Chevzovich). 2022. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. Chapter 9. P. 233-262.
- [4] S.Eh. Shirmovsky, A.V. Chizhov. BioSystems. 2023. V. 231. P. 104967.

## РЕПАРАЦИЯ ДНК И КЛОНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК МАММОСФЕР ЛИНИИ MCF-7 ПОСЛЕ ГАММА-НЕЙТРОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

*В. Г. Шуватова, Д. А. Шапошникова*

НИИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

e-mail: Shuvatova\_VG@nrcki.ru

*Резюме.* Изучено влияние  $\gamma$ ,n-излучения на репарацию двунитевых разрывов ДНК по уровню гистона  $\gamma$ H2AX с помощью проточной цитометрии и клоногенную активность клеток маммосфер линии MCF-7.  $\gamma$ ,n-Облучение дозозависимо снижает клоногенную активность облученных клеток и клеток маммосфер, выживших к 5-м суткам после облучения.  $\gamma$ ,n-Облучение в дозе 2 Гр индуцирует образование более высокого уровня двунитевых разрывов ДНК и более медленную их репарацию, чем  $\gamma$ -облучение в такой же дозе.

*Ключевые слова:* опухолевые стволовые клетки, маммосферы линии MCF-7, гамма-нейтронное излучение, радиочувствительность, клоногенная активность, двунитевые разрывы ДНК,  $\gamma$ H2AX

## DNA REPAIR AND CLONOGENIC ACTIVITY OF MCF-7 MAMMOSPHERE CELLS AFTER GAMMA-NEUTRON IRRADIATION

*V. G. Shuvatova, D. A. Shaposhnikova*

*NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia*

e-mail: Shuvatova\_VG@nrcki.ru

*Summary.* The effect of  $\gamma$ ,n-irradiation on the repair of DNA double-strand breaks by level of histone  $\gamma$ H2AX using flow cytometry and on the clonogenic activity of MCF-7 mammosphere cells was studied.  $\gamma$ ,n-Irradiation dose-dependently reduces the clonogenic activity of irradiated cells, and of mammosphere cells that survived by the 5th day after irradiation.  $\gamma$ ,n-Irradiation at a dose of 2 Gy induces the formation of a higher level of DNA double-strand breaks and their slower repair than  $\gamma$ -irradiation at the same dose.

*Key words:* cancer stem cells, MCF-7 mammospheres, gamma-neutron irradiation, radiosensitivity, clonogenic activity, DNA double-strand breaks,  $\gamma$ H2AX

Субпопуляция опухолевых стволовых клеток (ОСК), присутствующая в злокачественных опухолях разных типов, играет ключевую роль в инициации, развитии опухолевого процесса и метастазировании [1]. Одной из ключевых проблем радиационной онкологии является радиорезистентность ОСК. Устойчивость ОСК к действию редкоионизирующего излучения связывают с высокой эффективностью репарации радиационных повреждений ДНК; состоянием пролиферативного покоя, повышенной активностью антиоксидантных систем и активацией антиапоптотических сигнальных путей (STAT3, Wnt, Notch, Hedgehog, NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt/mTOR) в ответ на повреждение [2]. Известно, что  $\gamma$ -облучение в умеренных дозах приводит к увеличению доли ОСК в разных типах опухолей, включая рак молочной железы [3]. В связи с развитием адрионной терапии появился значительный интерес к исследованию чувствительности ОСК к действию плотноионизирующего излучения. Для изучения ОСК был разработан метод культивирования клеток в виде маммосфер, что позволяет увеличить размер этой субпопуляции опухолевых клеток в культуре [4].

Целью работы явилось изучение влияния  $\gamma$ ,n-излучения на репарацию двунитевых разрывов ДНК и клоногенную активность клеток маммосфер аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, в том числе клоногенную активность клеток, выживших к 5-м суткам после облучения.

Обогащенную ОСК культуру маммосфер получали при культивировании клеток линии MCF-7 в низкоадгезивных условиях в среде DMEM/F12 без фенолового красного, содержащей EGF 20 нг/мл, bFGF 10 нг/мл, B27 2%, гепарин 4 мкг/мл, инсулин 10 мкг/мл. Клетки после диссоциации маммосфер облучали в среде без факторов роста и добавки B27 на установке «ГУТ-200М» (источник  $^{60}\text{Co}$ ) в диапазоне доз 1–8 Гр при мощности дозы 0,75 Гр/мин.  $\gamma$ ,n-Облучение проводили на горизонтальном канале реактора «ИР-8» в диапазоне доз 0,5–2 Гр при мощности дозы 0,06 Гр/мин. Энергетический диапазон нейтронов составлял 0,5–10 МэВ, вклад нейтронов в поглощенную дозу составлял 30%. Для оценки влияния  $\gamma$ - и  $\gamma$ ,n-излучения на клоногенную активность клеток маммосфер после облучения клетки высаживали в 96-луночные планшеты в количестве от 200 до 1000 клеток/лунку, увеличивая количество высаженных клеток с увеличением дозы облучения. Через 7 суток после облучения подсчитывали количество маммосфер с помощью световой микроскопии и рассчитывали клоногенную активность облученных клеток по формуле: Клон. акт. = (РЕобл./РЕконтр.), где РЕ – количество маммосфер/количество высаженных клеток. Для оценки влияния  $\gamma$ ,n-облучения на клоногенную активность клеток, выживших к 5-м суткам после облучения, клетки после облучения культивировали в стандартных для маммосфер условиях в концентрации 20 клеток/мкл. Через 5 суток после облучения маммосферы диссоциировали, клетки высаживали в 96-луночные планшеты по 200 клеток/лунку (1 клетка/мкл) и через 7 суток подсчитывали количество маммосфер. Клоногенную активность выражали как долю от необлученного контроля. Строили дозовые зависимости и определяли значения D0 и Dq. Уровень двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках определяли по накоплению гистона  $\gamma\text{H2AX}$  через 1, 5 и 24 ч после  $\gamma$ -облучения в дозе 2 Гр и  $\gamma$ ,n-облучения в дозах 1 и 2 Гр с помощью проточной цитометрии.

Клоногенную активность клеток маммосфер оценивали по количеству маммосфер, каждая из которых представляет собой плавающую колонию, образованную одной ОСК. Поэтому количество образованных маммосфер соответствует количеству высаженных в культуру ОСК. По графикам зависимости клоногенной активности облученных клеток маммосфер от дозы  $\gamma$ - и  $\gamma$ ,n-излучения было установлено статистически значимое различие величины D0 для этих типов излучения, которое составило  $4,7 \pm 0,9$  Гр для клеток после  $\gamma$ -облучения и  $0,3 \pm 0,01$  для клеток после  $\gamma$ ,n-облучения. Дозовая кривая для клеток после  $\gamma$ -облучения имеет плечо, величина Dq составляет  $2,2 \pm 1,3$  Гр, что свидетельствует о репарации части сублетальных повреждений. Дозовая кривая для клеток после  $\gamma$ ,n-облучения имеет линейную форму без плеча. Исследование клоногенной активности клеток маммосфер, образованных выжившими после облучения клетками, показало, что  $\gamma$ ,n-облучение приводит к дозозависимому угнетению способности ОСК формировать маммосферы. Это коррелирует с полученными ранее данными о дозозависимом уменьшении количества ОСК в культурах маммосфер через 5 суток после  $\gamma$ ,n-облучения [5]. Истощение пула ОСК под действием  $\gamma$ ,n-излучения приводит к снижению клоногенной активности клеток, выживших к 5-м суткам после облучения. В результате  $\gamma$ ,n-облучения в клетках могут возникать сублетальные повреждения, в результате которых ОСК теряют способность к самообновлению и формированию маммосфер.

При определении уровня гистона  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках маммосфер через 1 ч после  $\gamma$ -облучения в дозе 2 Гр и  $\gamma$ ,n-облучения в дозах 1 и 2 Гр показано статистически значимое увеличение радиационно-индуцированных ДР ДНК до  $199 \pm 9\%$ ,  $203 \pm 5\%$  и  $252 \pm 12\%$  относительно необлученного контроля, соответственно. Через 5 ч после  $\gamma$ -облучения в дозе 2 Гр уровень гистона  $\gamma\text{H2AX}$  снизился до  $128 \pm 18\%$ , тогда как содержание гистона  $\gamma\text{H2AX}$  после  $\gamma$ ,n-облучения в дозах 1 и 2 Гр оставалось на более

высоком уровне:  $167 \pm 8\%$  и  $216 \pm 16\%$  от необлученного контроля, соответственно. Через 24 ч после  $\gamma$ -облучения в дозе 2 Гр и  $\gamma, n$ -облучения в дозе 1 Гр регистрировали остаточное содержание гистона  $\gamma H2AX$  на уровне  $110 \pm 15\%$  и  $119 \pm 5\%$ , соответственно, а после  $\gamma, n$ -облучения в дозе 2 Гр – на уровне  $154 \pm 14\%$  от соответствующего необлученного контроля.

Полученные результаты позволяют заключить, что клетки маммосфер линии MCF-7 обладают более высокой чувствительностью к действию  $\gamma, n$ -излучения по сравнению с  $\gamma$ -облучением.  $\gamma, n$ -Облучение дозозависимо снижает клоногенную активность не только непосредственно облученных клеток, но и клеток маммосфер, образованных выжившими после облучения клетками.  $\gamma, n$ -Облучение в дозе 2 Гр приводит к формированию более высокого уровня ДР ДНК и более медленной их репарации, чем  $\gamma$ -облучение в той же дозе. Через 24 ч после  $\gamma, n$ -облучения в дозе 2 Гр обнаружен более высокий уровень остаточных ДР ДНК по сравнению с  $\gamma$ -облучением в такой же дозе.

### Список литературы

1. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Res*. 2007. V.17. № 1. P. 3–14.
2. Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, Park HG, Han SI, Kang HS. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation // *Mol. Cancer*. 2017. V.16. № 1:10.
3. Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee DK, Li CJ. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells // *PLoS One*. 2012. V.7. № 8:e43628.
4. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 10:1253-70.
5. Shuvatova VG, Semochkina YP, Strepetov AN, Moskaleva EY. Sensitivity of MCF-7 mammosphere CSCs to neutron radiation // *J. Cancer Metastasis Treat*. 2022 V. 8:23.

## ВЛИЯНИЕ ПРОТОННОГО И $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ПУЛ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В МОДЕЛИ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ B16 *IN VIVO*

А.О. Якимова<sup>1</sup>, О.Н. Матчук<sup>1,2</sup>, Е.И. Селиванова<sup>1</sup>, В.Р. Гусарова<sup>1</sup>, В.А. Мосина<sup>1</sup>, С.Н. Корякин<sup>1,3</sup>, И.А. Замулаева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

<sup>2</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>3</sup> Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия  
e-mail: anna.prosovszkaya@gmail.com

*Резюме.* На модели мышинной меланомы B16 *in vivo* продемонстрированы отличия в действии протонного и фотонного ( $\gamma$ -) излучения на первичный очаг опухоли на молекулярном и клеточном уровнях. Показано, что одной из причин, определяющих менее выраженный клинический ответ опухоли на фотонную терапию по сравнению с протонной, может являться активация процесса эпителиально-мезенхимальной транзиции и увеличение пула опухолевых стволовых клеток после действия  $\gamma$ -излучения и отсутствие этих эффектов при использовании протонов.

*Ключевые слова:* экспрессия генов, меланома B16, радиотерапия, протоны,  $\gamma$ -излучение, опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальная транзиция

## EFFECTS OF PROTON AND $\gamma$ -IRRADIATION ON CANCER STEM CELL POPULATION AND GENE EXPRESSION IN B16 MOUSE MELANOMA MODEL *IN VIVO*

A.O. Yakimova<sup>1</sup>, O.N. Matchuk<sup>1,2</sup>, E.I. Selivanova<sup>1</sup>, V.R. Gusarova<sup>1</sup>, V.A. Mosina<sup>1</sup>, S.N. Koryakin<sup>1,3</sup>, I.A. Zamulaeva<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

<sup>2</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>3</sup>Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – Branch of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia  
e-mail: anna.prosovszkaya@gmail.com

*Summary.* Differences in the effects of proton and photon ( $\gamma$ -) radiation on the primary tumor focus were demonstrated at the molecular and cellular levels using the B16 mouse melanoma model *in vivo*. It has been shown that one of the reasons that determine the less pronounced clinical response of tumor to photon therapy compared to proton therapy may be activation of epithelial-mesenchymal transition and increase in cancer stem cell pool after  $\gamma$ -irradiation and the absence of these effects when using protons.

*Key words:* gene expression, B16 melanoma, radiotherapy, protons,  $\gamma$ -radiation, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition

Протонное и  $\gamma$ -излучение широко используется в современной клинической практике для лечения злокачественных новообразований различных локализаций. С точки зрения долговременных результатов лечения, протонное излучение имеет явные преимущества в дополнение к известному снижению лучевых осложнений со стороны нормальных тканей [1]. Так, в целом ряде исследований показано многократное



повышение выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости больных после протонной терапии по сравнению с этими показателями после стандартной радиотерапии с использованием фотонного излучения [2]. При этом большинство авторов признают, что относительная биологическая эффективность (ОБЭ) ускоренных протонов в клиническом диапазоне доз и энергий составляет всего 1,1, и именно эта величина учитывается при планировании протонной терапии. Следует заметить, что оценка ОБЭ выполнялась, как правило, в экспериментах *in vitro* и не учитывала изменения, происходящие на уровне организма [3]. В целом, имеющиеся клинические и экспериментальные данные указывают на актуальность поиска механизмов, отличающих биологическое действие протонов и фотонов (в том числе  $\gamma$ -квантов) в условиях *in vivo*. Поскольку существенное влияние на рост опухоли, метастазирование и исход лечения оказывают опухолевые стволовые клетки (ОСК), а важную роль в формировании пула ОСК играет эпителиально-мезенхимальная трансция (ЭМТ), именно эти процессы стали предметом изучения в настоящей работе.

Целью работы является изучение эффектов действия протонного и  $\gamma$ -излучения на пул ОСК и экспрессию генов, регулирующих ЭМТ и стволовые свойства клеток, на модели меланомы линии B16 *in vivo*.

**Материалы и методы.** Клетки меланомы B16 культивировали в стандартных условиях *in vitro*, затем вводили внутримышечно по 200 тыс. клеток в заднюю лапу самок мышей линии C57Bl/6j.

Облучение первичного очага меланомы в дозе 10 Гр осуществляли однократно на 10 сутки после трансплантации, когда опухоль становилась видна макроскопически. Локальное  $\gamma$ -облучение проводили на установке «Луч-1» от источника  $^{60}\text{Co}$ . Облучение протонами проводили на комплексе протонной терапии «Прометеус» в модифицированном пике Брэгга.

Через 2 и 9 суток после облучения осуществляли эвтаназию животных и забор аутопсийного материала из периферических участков опухоли. Оценка доли ОСК проводили при помощи проточной цитометрии по методу SP (Side Population). Образцы опухолей предварительно подвергали ферментативной дезагрегации и окрашиванию по методике, подробно описанной в работе [4].

Изменения в экспрессии генов (*Vim*, *N-cad*, *Trim28*) оценивали при помощи ПЦР в реальном времени методом  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , в качестве референса выбраны гены *Hprt* и *Ipo8*, показавшие наилучшую стабильность экспрессии в условиях этих экспериментов согласно данным сервиса RefFinder [5]. Дизайн геноспецифичных праймеров проводили при помощи онлайн-сервиса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

Статистическую обработку данных проводили при помощи программ «Origin 6.0» (Microcal Software, Inc.) и «Statistica 6.0» (StatSoft., Inc.).

Исследование одобрено Комиссией по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (разрешение № 1-СИ-00014 от 08.09.2020).

**Результаты и обсуждение.** В работе определена доля ОСК (клеток SP) через 2 и 9 суток после облучения протонами и  $\gamma$ -квантами в дозе 10Гр. Установлено, что на обоих сроках наблюдения после облучения протонами этот показатель соответствовал уровню необлученного контроля, что указывает на отсутствие резистентности популяции ОСК к протонному излучению по сравнению с остальными клетками. В то же время известно, что ОСК обладают более высокой устойчивостью к фотонному (рентгеновскому,  $\gamma$ -) излучению по сравнению с остальными опухолевыми клетками, что приводит к повышению доли ОСК после облучения, как показывают исследования многочисленных авторов, включая собственные [6]. В частности, по нашим данным

через 2 суток после  $\gamma$ -облучения наблюдается 7-кратное увеличение доли ОСК по сравнению с контрольным уровнем ( $p < 0,01$ ), которое со временем снижается до контрольных значений. Столь разительное отличие в действии протонов и  $\gamma$ -квантов на пул ОСК, вероятно, объясняется наличием плотной ионизирующего компонента в модифицированном пике Брэгга, что приводит к формированию более сложных повреждений ДНК, которые трудно репарируются даже в ОСК, исходно имеющих более эффективные системы репарации. Также можно предположить, что репрограммирование опухолевых клеток при облучении  $\gamma$ -квантами и протонами различается (в первом случае активируется переход не стволовых клеток в пул стволовых, во втором – этот процесс не активируется или снижается).

Полученные на клеточном уровне результаты хорошо согласуются с данными на молекулярном уровне. Установлено, что средний уровень экспрессии маркеров ЭМТ – генов *Vim* и *N-cad*, кодирующих белки виментин и N-кадгерин, соответственно, через 2 суток после  $\gamma$ -облучения несколько выше, чем после облучения протонами ( $p = 0,054$  для *Vim*,  $p = 0,002$  для *N-cad*). Следует отметить, что через 9 суток после протонного и  $\gamma$ -облучения уровень экспрессии этих генов не отличался в сравниваемых группах. В совокупности, эти данные свидетельствуют о смещении равновесия в сторону активации ЭМТ в близкие сроки после действия  $\gamma$ -излучения. Напротив, облучение протонами не приводит к такому эффекту. Примечательно, что в обоих случаях изменение экспрессии генов *Vim* и *N-cad* хорошо согласуется с изменением доли ОСК, что прекрасно соответствует современным представлениям о роли ЭМТ в генерации пула этих клеток. Еще одним аргументом в пользу существенных различий в реакции пула ОСК на воздействие изучаемых типов ионизирующего излучения является более выраженное снижение экспрессии гена *Trim28* под действием протонов, чем после  $\gamma$ -облучения ( $p = 0,0031$ ) через 2 суток после воздействия; через 9 суток отличия сохраняются на уровне статистической тенденции ( $p > 0,05$ ). Примечательно, что *Trim28* вовлечен в регуляцию ЭМТ и стволовых свойств клеток, а высокий уровень экспрессии этого гена коррелирует с плохим прогнозом для пациента.

Таким образом, эффекты действия протонного и  $\gamma$ -излучения на пул ОСК отличаются на молекулярном и клеточном уровнях. В совокупности, полученные данные позволяют заключить, что одной из причин менее выраженного клинического ответа опухоли на фотонную терапию по сравнению с протонной может являться активация процессов ЭМТ и увеличение пула ОСК после  $\gamma$ -облучения и отсутствие этих эффектов при использовании протонных пучков.

#### Список литературы:

6. Ng W.T., But B., Wong C.H.L., Choi C.W., Chua M.L.K., Blanchard P., Lee A.W.M. Clin Transl Radiat Oncol, 2022, V. 37, P. 41-56.
7. Yang J.T., Wijetunga N.A., Pentsova E., Wolden S., Young R.J., Correa D., Zhang Z., Zheng J., Steckler A., Bucwinska W., Bernstein A., Betof Warner A., Yu H., Kris M.G., Seidman A.D., Wilcox J.A., Malani R., Lin A., DeAngelis L.M., Lee N.Y., Powell S.N., Boire A. J Clin Oncol, 2022, V. 40, P. 3858-3867.
8. Wang L., Fossati P., Paganetti H., Ma L., Gillison M., Myers J.N., Hug E., Frank S.J. Int J Part Ther, 2021, V. 8, P. 3-13.
9. Zamulaeva I. A., Matchuk O. N., Selivanova E. I., Yakimova A. O., Mosina V. A., Koryakina S. N., Kaprin A. D., Boreyko A. V., Bugay A. N., Chausov V. N. and E. A. Krasavin. Physics of Particles and Nuclei Letters, 2023, V. 20, P. 63–75.
10. Xie, F., Wang, J., Zhang, B. Functional & Integrative Genomics, 2023, V. 23: 125 .
11. Матчук О. Н., Орлова Н. В., Замулаева И. А. Радиационная биология. Радиоэкология, 2016, №5, С. 487-493.

Научное издание

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ.  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ В РАДИОБИОЛОГИИ**

**Международная конференция**

*Материалы конференции*

2023-49

Ответственный за подготовку сборника к печати *И. В. Кошлань*.

Отпечатано с файлов, предоставленных оргкомитетом.

Подписано в печать 17.10.2023.

Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 8,13. Уч.-изд. л. 13,22. Тираж 135 экз. Заказ № 60740

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)