

ISSN 0869-8031

Том 64, Номер 2

Март - Апрель 2024



# РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ РАДИОЭКОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 64, номер 2, 2024

## Материалы VII Международной научно-практической конференции “Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения” (Томск, 21–22 марта 2023 г.)

Модели персонифицированных ксенотрансплантантов гемопоэтических стволовых клеток для оценки индивидуальной радиочувствительности человека

*Н.И. Атаманюк, Е.А. Пряхин* 115

Оценка степени метилирования ДНК в лимфоцитах после однократного облучения крови *in vitro*

*О.С. Цымбал, Д.С. Исубакова, Е. В. Брониовская, А.Ф. Николаева, В.О. Сигин, А.И. Калинин, В.М. Кириллов, Ж.А. Старцева, Н.В. Литвяков, И.В. Мильто, Р.М. Тахауов* 126

Ассоциация полиморфизмов генов *WNT* с частотой цитогенетических нарушений под действием ионизирующего излучения

*Д.С. Исубакова, Н.В. Литвяков, О.С. Цымбал, Т.В. Вишневецкая, М.Ю. Цыпенкова, И.В. Мильто, Р.М. Тахауов* 136

Цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* в отдаленные сроки после облучения ускоренными ионами криптона

*И.В. Кошлань, Н.А. Кошлань, М.Д. Исакова, Ю.В. Мельникова, А.Г. Беляева, А.А. Перевезенцев, А.С. Штемберг, И.Н. Клоц, Т.Е. Гвоздик, А.Н. Бугай* 145

Разработка терапевтического средства на основе *Escherichia coli*, оценка безвредности и противорадиационной активности

*Т.Р. Гайнутдинов, К.Н. Вагин* 157

Характеристика когорты персонала сублиматного производства Сибирского химического комбината, задействованного в работе с плутонием-239

*Д.Е. Калинин, Г.В. Горина, О.В. Литвинова, И.В. Мильто, А.Р. Тахауов, Л.Р. Тахауова, Ю.А. Самойлова, А.Б. Тривоженко, В.А. Авхименко, Р.М. Тахауов* 172

Патоморфологическая характеристика легочного фиброза у работников, подвергшихся профессиональному  $\alpha$ -облучению

*Г.В. Сычугов, Т.В. Азизова, С.В. Осовец, Е.Л. Казачков, Е.С. Григорьева, А.Г. Сычугов* 179

### Модификация радиационных эффектов

Водопроницаемая вода сокращает продолжительность жизни мышей при длительном фракционированном  $\gamma$ -облучении

*О.В. Никитенко, Т.М. Бычков, Д.М. Утина, В.Н. Гаевский, И.Б. Ушаков, А.А. Иванов* 195

### Радиоэкология

Миграция плутония, микро- и макроэлементов в системе “почва–растение” при разной влажности почвы

*М.А. Эдомская, С.Н. Лукашенко, А.А. Шупик, Д.А. Желтов, П.В. Харкин, В.А. Макарова* 204

### Хроника

Филиалу № 2 Института биофизики — 65 лет

*Р.М. Тахауов, И.В. Мильто* 216

Правила для авторов журнала “Радиационная биология. Радиоэкология”

218

# Contents

---

---

Vol. 64, No 2, 2024

---

---

## Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference “Medical and Environmental Effects of Ionizing Radiation” (Tomsk, March 21–22, 2023)

Models of Patient Derived Hematopoietic Stem Cell Xenografts for Assessing Individual Human Radiosensitivity) <i>N.I. Atamanyuk, E.A. Pryakhin</i>	115
Assessment of the Degree of DNA Methylation in Lymphocytes after a Single Blood Irradiation <i>in vitro</i> <i>O.S. Tsymbal, D.S. Isubakova, E.V. Bronikovskaya, A.F. Nikolaeva, V.O. Sigin, A.I. Kalinkin, V.M. Kirillov, Zh.A. Starzeva, N.V. Litviakov, I.V. Milto, R.M. Takhauov</i>	126
Association of <i>WNT</i> Gene Polymorphism with Frequency of Cytogenetic Disorders under the Action of Ionizing Radiation <i>D.S. Isubakova, N.V. Litviakov, O.S. Tsymbal, T.V. Vishnevskaya, M. Yu. Tsyplenkova, I.V. Milto, R.M. Takhauov</i>	136
Cytogenetic Violations in Blood Lymphocytes of <i>Macaca mulatta</i> Monkeys in the Long Term after Irradiation with Accelerated Krypton Ions <i>I.V. Koshlan, N.A. Koshlan, M.D. Isakova, Yu.V. Melnikova, A.G. Belyaeva, A.A. Perevezentsev, A.S. Stenberg, I.N. Klotz, T.E. Gvozdk, A.N. Bugay</i>	145
Development of a Therapeutic Agent Based on <i>Escherichia coli</i> , Assessment of Harmlessness and Anti-Radiation Activity <i>T.R. Gaynutdinov, K.N. Vagin</i>	157
Characteristics of the Cohort of Personnel of the Sublimate Production of the Siberian Chemical Plant Involved in Working with Plutonium-239 <i>D.E. Kalinkin, G.V. Gorina, O.V. Litvinova, I.V. Milto, A.R. Takhauov, L.R. Takhauova, Yu.A. Samoilova, A.B. Trivozhenko, V.A. Avkhimenko, R.M. Takhauov</i>	172
Pathomorphological Features of Lung Fibrosis in Individuals Occupationally Exposed to Alpha Radiation <i>G.V. Sychugov, T.V. Azizova, S.V. Osovets, E.L. Kazachkov, E.S. Grigoryeva, A.G. Sychugov</i>	179

### Modification of Radiation Effects

Tap Water Shortens the Lifespan of Mice with Prolonged Exposure to Fractionated $\gamma$ -Radiation <i>O.V. Nikitenko, T.M. Bychkova, D.M. Utina, V.N. Gaevsky, I.B. Ushakov, A.A. Ivanov</i>	195
--	-----

### Radioecology

Migration of Plutonium, Micro- and Macroelements in the “Soil–Plant” System at Different Soil Moisture <i>M.A. Edomskaya, S.N. Lukashenko, A.A. Shupik, D.A. Zheltov, P.V. Kharkin, V.A. Makarova</i>	204
--	-----

### Chronicle

Branch No. 2 of the Institute of Biophysics – 65 Years <i>R.M. Takhaaov, I.V. Milto, E.V. Kurbatova</i>	216
Rules for the Authors of the Journal "Radiation Biology. Radioecology"	218

---

---

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]::576.53:57.085.23:611.018.46:599.323.4:539.1.047

**МОДЕЛИ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ КСЕНОТРАНСПЛАНТАНТОВ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ  
РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

© 2024 г. Н. И. Атаманюк<sup>1\*</sup>, Е. А. Пряхин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уральский научно-практический центр радиационной медицины  
Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия

\*E-mail: atamanjuk@urcrm.ru

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 26.01.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Существуют разные подходы к оценке индивидуальной радиочувствительности человека. В данной работе индивидуальную радиочувствительность оценивали по показателям выживаемости и восстановления гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека после воздействия острого  $\gamma$ -излучения на гуманизированных мышей. Иммунодефицитным мышам NOD SCID трансплантировали ГСК пуповинной крови внутривенно, ГСК периферической или пуповинной крови внутрикостно. Рассчитанная для ГСК человека величина  $D_0$  составила 1.19 Гр (95% ДИ от 0.90 до 1.74), 0.99 Гр (95% ДИ от 0.87 до 1.15) и 0.93 Гр (95% ДИ от 0.61 до 1.91) для трех способов получения гуманизированных мышей соответственно. Для всех трех способов гуманизации мышей получены статистически не отличающиеся модели, описывающие зависимость выживаемости ГСК от дозы острого  $\gamma$ -облучения в диапазоне 0.5–1.5 Гр. Таким образом, внутрикостное введение ГСК периферической крови иммунодефицитным мышам может быть эффективно использовано для оценки реакции ГСК человека на радиационное воздействие. Сравнение числа ГСК (CD34<sup>+</sup> клеток) и их потомков (CD45<sup>+</sup> клеток) у необлученных и облученных мышей, гуманизированных клетками одного и того же донора, на 3- и 14-е сутки после облучения позволяет оценивать процессы радиационно-индуцированной гибели и восстановления ГСК. Предложен коэффициент, рассчитанный как отношение доли ГСК среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей на 14-е сутки к доле ГСК на 3-и сутки после облучения, для оценки реакции на радиационное воздействие. Этот коэффициент имел обратную линейную зависимость от дозы облучения, различался у мышей с повышенной и нормальной радиочувствительностью, повышался при применении радиопротектора цистеамин у гуманизированных мышей. Предложено использование этого коэффициента для сравнительной оценки радиочувствительности человека.

**Ключевые слова:** индивидуальная радиочувствительность, гемопоэтические стволовые клетки, ксенотрансплантация, ионизирующее излучение, тканевые реакции

**DOI:** 10.31857/S0869803124020019, **EDN:** NBPVXR

Важной задачей современной радиобиологии является поиск маркеров индивидуальной радиочувствительности для персонализации рисков, связанных с радиационным воздействием, как у профессионалов, работающих с источниками ионизирующих излучений, так и у пациентов, проходящих лучевую терапию [1].

Индивидуальная радиочувствительность может быть рассмотрена по меньшей мере с точки зрения двух различных аспектов действия ионизирующего излучения у разных индивидов при облучении в одной дозе: радиочувствительность целого организма или критических тканей, определяемая как гибель

или развитие детерминированных тканевых эффектов; радиочувствительность тканей как склонность к развитию неблагоприятных отдаленных последствий, радиационно-индуцированного рака [2–4].

Исследованы различные молекулярно-генетические предикторы персонализированных тканевых реакций на радиационное воздействие, хотя не всегда удается выявить связь между молекулярными и клеточными реакциями *in vitro* и тяжестью тканевых реакций на острое облучение [5, 6]. Для возможности индивидуально прогнозировать тяжесть детерминированных тканевых реакций

необходимо определить биомаркеры радиационного воздействия для наиболее важных, критических органов и тканей, определяющих выраженность лучевых поражений. Такие маркеры могут найти применение при отборе персонала группы А для минимизации острых тканевых реакций при планируемом повышенном облучении, для выделения групп риска повышенного развития неблагоприятных побочных эффектов среди пациентов, проходящих лучевую терапию, для отбора космонавтов для длительных космических миссий вне защитного действия магнитного поля земли.

Кроветворная система является одной из критических систем организма, в первую очередь реагирующих на ионизирующее излучение и определяющих тяжесть и характер течения радиационного поражения организма человека и животных [7]. Степень опустошения костного мозга и его последующей репопуляции за счет выживших пролиферирующих клеток является основным интегральным показателем реакции костного мозга на облучение; для костномозговой формы острого лучевого синдрома последствия для организма (вероятность гибели) существенным образом определяются выживаемостью гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и кинетикой выживших клеточных популяций [8, 9].

Одним из перспективных подходов к решению задачи оценки индивидуальных предикторов развития детерминированных тканевых реакций и тяжести лучевого поражения может быть модель гуманизированных животных, полученных путем ксенотрансплантации ГСК человека иммунодефицитным мышам. В такой модели можно оценить реакцию ГСК на облучение, изучить функциональную активность ГСК, оценить вызванные облучением изменения в экспрессии генов и в направлениях дифференцировки облученных клеток [10–12].

Известно, что ГСК и прогениторные клетки человека проявляют индивидуальные отличия радиочувствительности [13], выживаемость и клоногенная активность ГСК может служить предиктором тканевых реакций со стороны костного мозга, определяющих связанную с детерминированными эффектами выживаемость организма после облучения [4, 14]. Моделирование реакции ГСК на облучение при ксенотрансплантации дает возможность разработать новые подходы к оценке персонифицированной реакции ГСК человека на облучение, так как гуманизированные мыши могут рассматриваться как «аватары», отражающие весь

комплекс особенностей реакции клеток, свойственный донору клеток [15–17].

Предложенный в данной работе подход оценки персонифицированной реакции основан на определении выживаемости и сохранения способности к пролиферации и дифференцировке ГСК человека после острого внешнего  $\gamma$ -облучения. Цель работы — разработка модели для изучения индивидуальной радиочувствительности человека на основе оценки выживаемости и сохранения пролиферативной активности ГСК человека в персонифицированных ксенотрансплантатах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве реципиентов клеток человека использовали мышей линии NOD SCID (CB17-Prkdc<sup>scid</sup>) из Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. Животных содержали в SPF-условиях, на стандартном рационе без ограничения подачи корма и питьевой воды.

Работы с животными и биоматериалом человека одобрены Этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России, проведены с соблюдением международных норм гуманного обращения с экспериментальными животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986 г., Страсбург) и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г.

ГСК человека выделяли из пуповинной или периферической крови. Пуповинную кровь после получения добровольного информированного согласия донора отбирали в ГБУЗ “Областной перинатальный центр” г. Челябинска. ГСК периферической крови получали из продукта донорской крови — лейкотромбослоя, изготовленного ГБУЗ “Станция переливания крови” ФМБА России в г. Челябинске.

ГСК идентифицировали как CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup> клетки, полученные путем иммуномагнитной позитивной селекции с помощью коммерческого набора EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II (Stem Cell Technologies, Канада) согласно инструкции производителя. После отмывки клеток в среде 199 с солями Хенкса с глутамином (“ПанЭко”, Россия) подсчитывали их количество на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD Biosciences, США). Доля ГСК в полученной клеточной

суспензии составляла 80–90%. Клетки от каждого донора делили на 3–5 равных частей для введения нескольким мышам. Поскольку от каждого донора было получено разное количество ГСК, животные получали от 30 до 200 тыс. клеток при введении ГСК от разных доноров.

Использовали три способа получения гуманизированных мышей. Первая модель является классическим способом получения мышей, гуманизированных гемопоэтическими клетками человека [18]: ГСК пуповинной крови вводили животным внутривенно в боковую хвостовую вену после предварительной миелосупрессии путем воздействия острого внешнего  $\gamma$ -излучения на мышей в дозе 2.5 Гр. Животных подвергали последующему экспериментальному воздействию через 9 нед. после трансплантации ГСК. Таким способом использованы ГСК 12 доноров пуповинной крови.

Через 9 нед. животных подвергали воздействию облучения на исследовательской радиобиологической  $\gamma$ -установке ИГУР-1М ( $^{137}\text{Cs}$ -источники, мощность дозы 0.91 Гр/мин, неравномерность  $\gamma$ -поля не более 5%) в дозах 0.5 Гр, 1.0 Гр или 1.5 Гр, при этом по одному животному для каждого донора ГСК оставляли необлученным. Через 3 и 14 сут после облучения у мышей извлекали костный мозг из бедренной кости для измерения содержания клеток человека.

Во второй модели использовали ГСК периферической крови. Эти клетки сопоставимы с ГСК пуповинной крови по жизнеспособности и потенциалу дифференцировки, однако значительно хуже приживаются у иммунодефицитных мышей [19]. Поэтому в данной модели не давали дополнительного времени для приживания ГСК, а для повышения уровня химеризма клетки трансплантировали в канал большой берцовой кости со стороны проксимального эпифиза; процедуру проводили с применением изофлуранового наркоза. Клетки от каждого донора (всего девять доноров периферической крови) делили на четырех мышей. При этом двух мышей облучали за 30 мин до трансплантации клеток (ГСК человека не облучены), а двух мышей, получивших клетки от того же донора, облучали через 30 мин после введения ГСК (человеческие клетки облучены). Облучение проводили в дозах 0.5, 1.0 и 1.5 Гр (по три донора на каждую дозу). Через 3 и 14 сут после облучения у животных извлекали ту большую берцовую кость, в которую проводилась инъекция клеток, для анализа числа клеток человека в костном мозге (для каждого срока — одна мышь с необ-

лученными ГСК человека и одна — с получившими облучение клетками).

В третьей модели проводили эксперимент по схеме, описанной для ГСК периферической крови, однако использовали ГСК пуповинной крови (всего девять доноров).

Идентифицировали клетки человека методом проточной цитометрии на цитометре Accuri C6 (BD Biosciences, США) после окраски моноклональными антителами с флуоресцентными метками. Подсчитывали в костном мозге мышинные  $\text{CD45}^+$  клетки (окраска моноклональными крысиными антителами анти $\text{CD45-PE}$ , клон 30-F11, BD Pharmingen, США); человеческие лейкоцитарные  $\text{CD45}^+$  клетки (окраска моноклональными мышинными антителами анти $\text{CD45-FITC}$ , клон HI30, Stem Cell Technologies, Канада); человеческие стволовые  $\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD34}^+$  клетки (окраска моноклональными мышинными антителами анти $\text{CD34-APC}$ , клон 581, Stem Cell Technologies, Канада), применяли блокатор Fc-рецепторов мыши Mouse BD Fc Block  $\text{CD16/CD32}$  (BD Pharmingen) и блокатор Fc-рецепторов человека Human BD Fc Block (BD Pharmingen). Рассчитывали количество клеток в мл суспензии, полученной из одной кости.

У животных с необлученным ГСК в каждой модели также измеряли содержание  $\text{CD45}^+$  клеток человека в периферической крови (в пересчете на 1 мл) и селезенке (в пересчете на орган), содержание  $\text{CD34}^+$  клеток в селезенке. Поскольку всем животным трансплантировали разное количество клеток человека, для сравнения моделей результаты стандартизовали на 100 000 введенных ГСК человека.

Во всех моделях рассчитывали отношение числа  $\text{CD34}^+$  и  $\text{CD45}^+$  клеток через 3 сут после облучения к числу клеток того же донора без облучения (оценка выживаемости клеток), а также через 14 сут после облучения (относительное число клеток, характеризующее эффективность восстановления после облучения). Рассчитывали процентное содержание ГСК от общего количества всех  $\text{CD45}^{\text{low/+}}$  клеток человека для каждой гуманизированной мыши. Также определяли коэффициент, равный отношению доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на 3-и сутки после облучения ( $K_{14/3}$ ).

Ранее было показано, что этот коэффициент  $K_{14/3}$  зависит от дозы радиационного воздействия и может быть использован для оценки радиочувствительности мышей разных линий [20]. Для оценки прогностических свойств коэффициента  $K_{14/3}$  для оценки персонафицированной реакции ГСК человека на радиационное воздействие и связь этого показателя

с радиочувствительностью проводили два эксперимента.

В первом эксперименте измеряли коэффициент  $K_{14/3}$  для доли стволовых кровяных клеток CD117<sup>+</sup> клеток мыши после облучения в дозе 1 Гр у мышей двух линий, отличающихся радиочувствительностью: радиочувствительной линии NOD SCID (ЛД<sub>50/30</sub> = 3.5 Гр) и относительно радиорезистентной линии C57Bl/6 (ЛД<sub>50/30</sub> = 6.0 Гр).

Во втором эксперименте ГСК, полученные от трех доноров пуповинной крови, использовали для гуманизации не трех, а пяти мышей. Животным за 30 мин до облучения водили внутривенно препарат с известным радиозащитным действием — 2-меркаптоэтиламин (цистеамин) в дозе 200 мг/кг массы тела (Serva, США). Животных от двух доноров облучали в дозе 0.5 Гр, а от третьего донора — в дозе 1 Гр. Сравнивали коэффициент  $K_{14/3}$  у гуманизированных мышей без цистеамина и у мышей с повышенной за счет цистеамина радиорезистентностью.

Для измеренных показателей определяли среднее значение и стандартную ошибку. Описывали зависимость изучаемых показателей от дозы методом регрессионного анализа. Для оценки радиочувствительности ГСК рассчитывали по результатам регрессионного анализа выживаемости ГСК через 3 сут после облучения величину  $D_0$  — дозу, при которой выживают 37% клеток от их исходного количества, и ее 95%-ный доверительный интервал. Сравнивали показатели разных моделей с использованием t-критерия Стьюдента, отличия принимали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 указаны результаты измерения клеток человека у гуманизированных животных без облучения ГСК человека в разных моделях.

В модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови и последующим приживлением клеток в течение 9 нед. в костном мозге мышей регистрируется пул стволовых гемопоэтических клеток в количестве, существенно превышающем введенное число ГСК, а также пул созревающих лейкоцитарных CD45<sup>+</sup> клеток. Всего на долю клеток человека приходилось от 7 до 70% всех CD45<sup>+</sup> клеток костного мозга мыши в зависимости от числа введенных ГСК. Часть CD45<sup>+</sup> клеток человека также заселяли селезенку (составляя в ней в среднем 18% от всех человеческих и мышинных CD45<sup>+</sup> клеток) и в небольшом количестве регистрировались в пери-

ферической крови (в среднем 2.4% от всех лейкоцитов периферической крови).

При введении ГСК периферической крови стволовые клетки человека неспособны к длительной репопуляции в костном мозге животных, однако ранее было показано, что возможно использовать ГСК периферической крови для коротких экспериментов в модели гуманизированных мышей [21]. При сравнении эффективности трансплантации ГСК, полученных из периферической или пуповинной крови, при их введении в костномозговой канал большой берцовой кости видно, что ГСК пуповинной крови обладают способностью к увеличению своей популяции в костном мозге и одновременно к дифференцировке в зрелые CD45<sup>+</sup> клетки, в отличие от ГСК периферической крови, количество которых в костном мозге мышей не изменяется в течение 14 сут.

В обеих краткосрочных моделях отмечена сопоставимая способность клеток человека заселять селезенку (в среднем 1.4% всех CD45<sup>+</sup> клеток селезенки — человеческие, из них около половины экспрессируют маркер стволовых клеток CD34<sup>+</sup>) и поддерживать пул зрелых клеток, циркулирующих в периферической крови (в среднем 1.3% от всех лейкоцитов — клетки человека).

На 3-и сутки после облучения во всех моделях выживаемость ГСК описывалась экспоненциальной моделью (рис. 1, А).

Применение регрессионного анализа показало статистически значимую зависимость выживаемости ГСК на 3-и сутки после облучения от дозы. Уравнение (1) для модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови ( $R^2 = 0.67$ ;  $F = 38.65$ ;  $p < 0.001$ ) имело следующий вид:

$$y = 0.98e^{-0.84x}, \quad (1)$$

где  $y$  — выживаемость ГСК,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

Уравнение (2) для модели ГСК периферической крови имело вид ( $R^2 = 0.93$ ;  $F = 211$ ;  $p < 0.001$ ):

$$y = 0.97e^{-1.1x}, \quad (2)$$

где  $y$  — выживаемость ГСК,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

Уравнение (3) для модели ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении имело вид ( $R^2 = 0.55$ ;  $F = 14.90$ ;  $p = 0.002$ ):

$$y = 0.92e^{-1.1x}, \quad (3)$$

где  $y$  — выживаемость ГСК,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

**Таблица 1.** Содержание клеток человека в органах и тканях гуманизированных мышей,  $M \pm m$   
**Table 1.** Human cell number in organs and tissues of humanized mice,  $M \pm m$

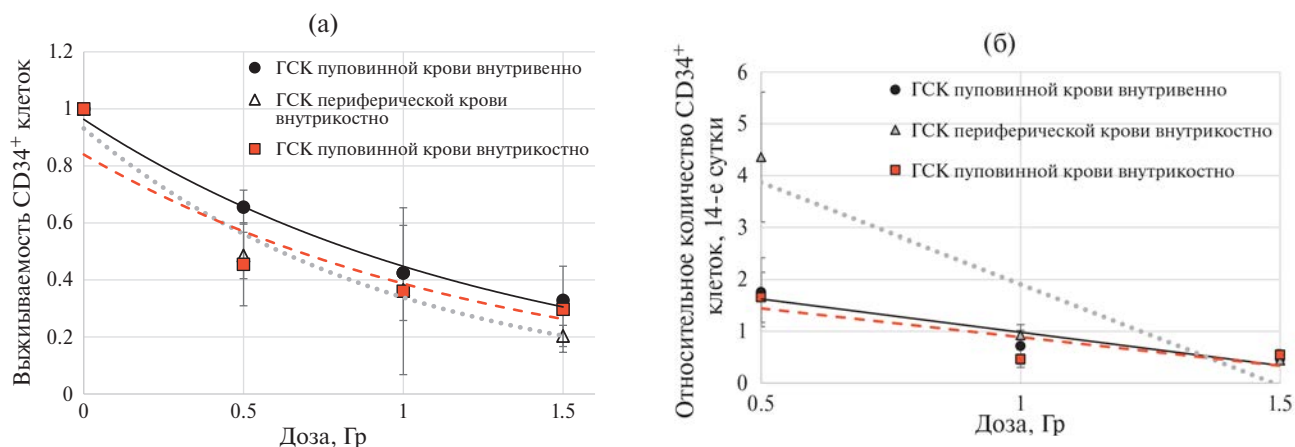
Экспериментальная модель		ГСК пуповинной крови внутривенно	ГСК периферической крови внутрикостно		ГСК пуповинной крови внутрикостно	
			3 сут	14 сут	3 сут	14 сут
Время после трансплантации		9 нед.	3 сут	14 сут	3 сут	14 сут
Кровь, тыс. CD45 <sup>+</sup> клеток/мл		19 ± 7	7.7 ± 1.6	12 ± 5	18.5 ± 4.3	25.4 ± 1.4
Селезенка, тыс. клеток/орган	CD34 <sup>+</sup>	13.3 ± 4.5	4.3 ± 2.1	19.5 ± 6.7	4.7 ± 1.8	11.4 ± 4.3
	CD45 <sup>+</sup>	420 ± 170	10.8 ± 3.5	22 ± 10	11.7 ± 0.4	26.6 ± 4.1
Костный мозг, тыс. клеток/кость*	CD34 <sup>+</sup>	330 ± 170	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	2.6 ± 1.5
	CD45 <sup>+</sup>	990 ± 380	5.5 ± 1.8	5.3 ± 2.3	3.2 ± 0.4	10.5 ± 3.5

Примечание: \* — в модели внутривенного введения ГСК пуповинной крови — данные для бедренной кости; в моделях с внутрикостным введением ГСК — данные для большой берцовой кости.

Важно отметить, что модели, описывающие зависимость выживаемости клеток от дозы, полученные для ГСК пуповинной крови с внутривенным введением и периферической крови, не отличались: нет статистически значимых отличий при сравнении коэффициентов ( $t = 1.18; p = 0.24$ ) и свободного члена ( $t = 0.15; p = 0.88$ ) в уравнениях зависимости выживаемости ГСК от дозы на 3-и сутки после облучения. Также нет статистически значимых отличий выживаемости ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении от выживаемости ГСК пуповинной крови при внутривенном введении при сравнении в уравнениях зависимости коэффициентов ( $t = 0.78; p = 0.24$ ) и свободного члена ( $t = 0.22; p = 0.82$ ). Нет отличий при сравнении

моделей с внутрикостным введением ГСК пуповинной и периферической крови при сравнении коэффициентов ( $t = 0.22; p = 0.83$ ) и свободного члена ( $t = 0.32; p = 0.75$ ) в уравнениях зависимости выживаемости ГСК от дозы на 3-и сутки после облучения.

На основании результатов регрессионного анализа выживаемости клеток через 3 сут после облучения были рассчитаны значения  $D_0$  для ГСК. В модели длительного приживания ГСК пуповинной крови значение  $D_0$  составило 1.19 Гр, в модели с ГСК периферической крови  $D_0$  была равна 0.99 Гр, а в краткосрочной модели ГСК пуповинной крови  $D_0$  имела значение 0.93 Гр. Все величины  $D_0$  оказались близки друг к другу (рис. 2) и соот-



**Рис. 1.** Относительное количество ГСК человека после облучения по отношению к необлученному контролю в трех моделях гуманизированных животных. А — 3-и сутки после облучения; Б — 14-е сутки после облучения.

**Fig. 1.** Human HSC number after irradiation relative to non-irradiated control in three humanized mice models. А — 3rd day after irradiation; Б — 14th day after irradiation.



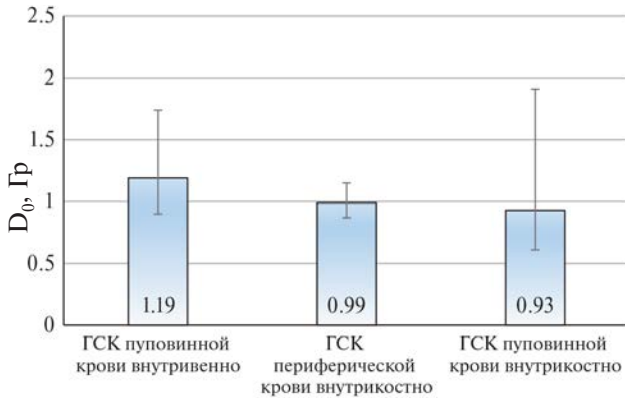


Рис. 2.  $D_0$  для ГСК человека, рассчитанная в разных моделях получения гуманизированных мышей.

Fig. 2.  $D_0$  for human HSCs, estimated in different humanized mice models.

ветствовали литературным данным, приводящим значение  $D_0$  для ГСК человека около 1 Гр [22].

На 14-е сутки после облучения количество клеток по отношению к необлученному контролю описывалось линейной функцией, имело обратную зависимость от дозы (для модели ГСК пуповинной крови модель статистически не значима; для ГСК периферической крови  $R^2 = 0.65$ ;  $F = 12.90$ ;  $p = 0.009$ ; для ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении  $R^2 = 0.44$ ;  $F = 5.5$ ;  $p = 0.05$ ) (рис. 1, Б). Следует отметить, что после облучения в дозе 0.5 Гр количество ГСК могло как превышать их контрольный уровень у необлученных животных (относительное количество ГСК больше 1), так и оставаться сниженным у отдельных доноров.

Уравнения, описывающие изменение относительного количества  $CD34^+$  клеток на 14-е сутки после облучения, не имели статистически значимых отличий друг от друга. Для моделей с внутривенным введением ГСК пуповинной крови и внутрикостным введением ГСК периферической крови нет статистически значимых отличий при сравнении угла наклона ( $t = 0.19$ ;  $p = 0.85$ ) и свободного члена ( $t = 0.34$ ;  $p = 0.74$ ) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения. Также нет статистически значимых отличий при сравнении угла наклона ( $t = 0.22$ ;  $p = 0.83$ ) и свободного члена ( $t = 0.22$ ;  $p = 0.83$ ) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения в моделях с внутривенным и внутрикостным введением ГСК пуповинной крови. Нет отличий при сравнении моделей с внутрикостным введением ГСК пуповинной и периферической крови при

сравнении угла наклона ( $t = 0.52$ ;  $p = 0.61$ ) и свободного члена ( $t = 0.69$ ;  $p = 0.49$ ) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения.

Было выявлено дозозависимое снижение выживаемости созревающих  $CD45^+$  клеток человека на 3-и сутки после облучения у гуманизированных мышей во всех трех моделях (рис. 3, А). Зависимость количества  $CD45^+$  клеток человека от дозы статистически значимо описывалась линейной моделью (для модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови  $R^2 = 0.71$ ;  $F = 45.94$ ;  $p < 0.001$ ; для модели с внутрикостным введением ГСК периферической крови  $R^2 = 0.92$ ;  $F = 192$ ;  $p < 0.001$ ; для модели с внутрикостным введением ГСК пуповинной крови  $R^2 = 0.49$ ;  $F = 11.66$ ;  $p = 0.005$ ).

Если на 3-и сутки после облучения количество  $CD45^+$  клеток у облученных гуманизированных мышей всегда было меньше, чем у необлученных

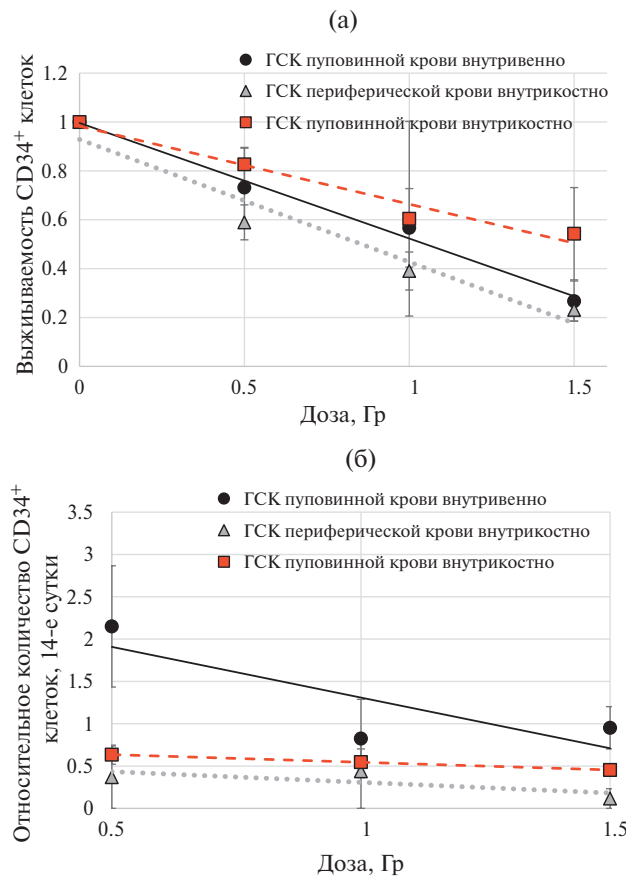


Рис. 3. Относительное количество  $CD45^+$  клеток человека после облучения по отношению к необлученному контролю в трех моделях гуманизированных животных. А — 3-и сутки после облучения; Б — 14-е сутки после облучения.

Fig. 3. Human  $CD45^+$  cell number after irradiation relative to non-irradiated control in three humanized mice models. А — 3rd day after irradiation; В — 14th day after irradiation.

животных, получивших ГСК от того же донора, то на 14-е сутки после облучения содержание CD45<sup>+</sup> клеток увеличивалось и у некоторых доноров превышало этот показатель у необлученных мышей, гуманизированных клетками того же донора (рис. 3, Б). Статистически значимой зависимости количества CD45<sup>+</sup> клеток от дозы через 14 сут после облучения получено не было.

Как было показано в работе [20], отношение доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на 3-и сутки после облучения у мышей зависело от дозы и было связано с радиочувствительностью мышей разных линий. В настоящей работе этот коэффициент был рассчитан для описания изменения доли ГСК человека после облучения гуманизированных мышей. Во всех трех моделях коэффициент  $K_{14/3}$  имел обратную линейную зависимость от дозы. В модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови зависимость коэффициента  $K_{14/3}$  от дозы облучения описывалась уравнением (4) ( $R^2 = 0.57$ ;  $F = 13.26$ ;  $p = 0.005$ ):

$$y = 1.03 - 0.41x \quad (4)$$

где  $y$  —  $K_{14/3}$ ,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

В модели с внутрикостным введением ГСК периферической крови зависимость коэффициента  $K_{14/3}$  от дозы облучения описывалась уравнением (5) ( $R^2 = 0.45$ ;  $F = 5.67$ ;  $p = 0.048$ ):

$$y = 3.5 - 2.1x, \quad (5)$$

где  $y$  —  $K_{14/3}$ ,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

Для модели с внутрикостным введением ГСК пуповинной крови зависимость коэффициента

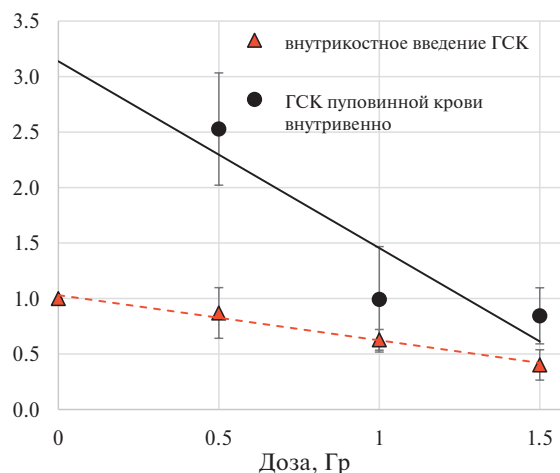


Рис. 4. Зависимость коэффициента  $K_{14/3}$  от дозы для моделей с разным способом введения ГСК.

Fig. 4.  $C_{14/3}$  coefficient dependence on the dose for models with different methods of HSC administration.

$K_{14/3}$  от дозы облучения описывалась уравнением 6 ( $R^2 = 0.25$ ;  $F = 2.04$ ;  $p = 0.2$ ):

$$y = 2.8 - 1.2x, \quad (6)$$

где  $y$  —  $K_{14/3}$ ,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

В модели ГСК пуповинной крови с длительным приживлением коэффициент  $K_{14/3}$  оказался ниже, чем в моделях короткого эксперимента, что может быть связано с отличиями в кинетике клеточных популяций сразу после трансплантации и спустя 9 нед., необходимых для установления равновесного состояния пула ГСК в костном мозге гуманизированной мыши (рис. 4). Однако нет статистически значимых отличий в моделях зависимости коэф-

Таблица 2. Изменение коэффициента  $K_{14/3}$  в экспериментальных моделях высокой и низкой радиорезистентности  
Table 2. Change in the  $C_{14/3}$  coefficient in experimental models of high and low radioresistance

Радиочувствительная модель		Радиорезистентная модель	
Разные линии мышей			
NOD SCID		C57Bl/6	
$0.23 \pm 0.06$		$0.98 \pm 0.18^*$ $t = 3.9$ ; $p < 0.003$	
Гуманизированные мыши			
донор 1, доза 0.5 Гр	$0.45 \pm 0.03$	$1.2 \pm 0.12^*$ $t = 6.0$ ; $p < 0.001$	
донор 2, доза 0.5 Гр	$1.2 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.18^*$ $t = 2.0$ ; $p = 0.04$	
донор 3, доза 1.0 Гр	$0.50 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.08^*$ $t = 5.3$ ; $p < 0.001$	

\* Статистически значимые отличия от радиочувствительной модели.

коэффициента  $K_{14/3}$  от дозы для ГСК периферической и пуповинной крови в краткосрочном тесте при внутрикостном введении, при сравнении коэффициента угла наклона прямой  $t = 0.72$ ;  $p = 0.48$ , при сравнении свободного члена  $t = 0.56$ ;  $p = 0.58$ . Поэтому результаты оценки коэффициента  $K_{14/3}$  в моделях с внутрикостным введением ГСК были описаны одной зависимостью, представленной в уравнении (7) ( $R^2 = 0.35$ ;  $F = 8.07$ ;  $p = 0.01$ ):

$$y = 1.7 - 3.2x, \quad (7)$$

где  $y$  —  $K_{14/3}$ ,  $x$  — доза  $\gamma$ -облучения, Гр.

В двух отдельных экспериментах была проведена валидация применения коэффициента  $K_{14/3}$  для оценки радиочувствительности. В одном эксперименте рассчитывали коэффициент для мышей радиочувствительной линии NOD SCID ( $LD_{50/30} = 3.5$  Гр) и мышей с обычной радиочувствительностью C57Bl/6 ( $LD_{50/30} = 6.0$  Гр). В другом эксперименте сравнивали коэффициент у гуманизированных животных, где повышенную радиорезистентность моделировали путем введения цистеамина за 30 минут до облучения. У мышей линии C57Bl/6 и гуманизированных мышей, защищенных радиопротектором,  $K_{14/3}$  был статистически значимо выше (табл. 2).

Таким образом, расчет коэффициента  $K_{14/3}$  на основании данных о количестве ГСК и CD45<sup>+</sup> клеток на 3-и и 14-е сутки после облучения для данного донора в модели персонифицированных ксенотрансплантантов ГСК может быть использован для оценки индивидуальной радиочувствительности человека. При этом более высокие значения коэффициента  $K_{14/3}$  можно интерпретировать как проявления более высокой радиорезистентности. На рис. 5 представлено распределение значений коэффициента  $K_{14/3}$  по отношению к среднему значению  $K_{14/3}$  в каждой дозовой группе для 17 доноров. Распределение этого показателя хорошо (критерий Колмогорова—Смирнова 0.13;  $p = 0.90$ ; критерий  $\chi^2 = 0.31$ ,  $p = 0.57$ ) описывается логнормальным распределением. Как видно из рис. 5, среди исследованных доноров можно выделить отдельных лиц с повышенными значениями коэффициента  $K_{14/3}$ , которых можно охарактеризовать как радиорезистентных. Доля таких доноров в исследованной выборке составила 17%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Модель получения гуманизированных мышей путем внутривенного введения ГСК пуповинной крови после облучения мышей в сублетальной дозе

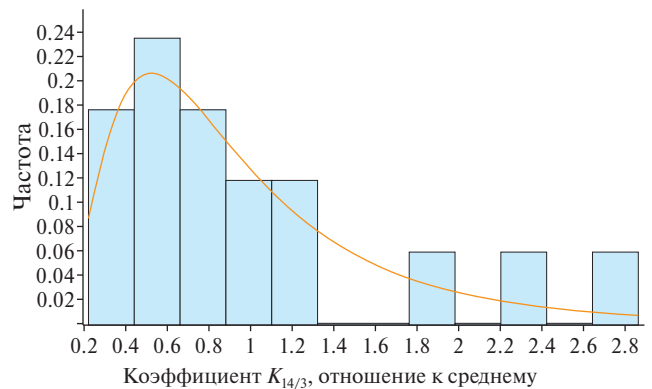


Рис. 5. Распределение значений коэффициента  $K_{14/3}$  по отношению к среднему значению  $K_{14/3}$  в каждой дозовой группе для обследованных доноров.

Fig. 5. Distribution of  $C_{14/3}$  coefficient values in relation to the average  $C_{14/3}$  value in each dose group for the studied donors.

является распространенным методом, нашедшим свое применение в разных областях экспериментальной биологии и биомедицины [18]. Однако пуповинная кровь не может рассматриваться как источник ГСК для целей оценки индивидуальных реакций ГСК взрослых людей. Применение ГСК, полученных из мобилизованной с помощью ГКСФ периферической крови, оказывается менее эффективным, чем ГСК пуповинной крови [19], кроме того, мобилизация ГСК в периферическую кровь является болезненной процедурой. Более удобным было бы использование ГСК из немобилизованной периферической крови у взрослых людей, работа с которыми возможна в относительно короткий промежуток времени после введения.

Для решения вопроса о возможности использовать ГСК немобилизованной периферической крови для оценки их выживаемости и восстановления после облучения сравнивали показатели ГСК после острого  $\gamma$ -облучения в трех моделях: внутривенном введении ГСК пуповинной крови с длительным (9 нед.) временем приживания клеток; внутрикостном введении ГСК периферической крови с одновременным введением и облучением; внутрикостном введении ГСК пуповинной крови с одновременным введением и облучением.

Проведенные исследования показали, что внутрикостное введение ГСК периферической или пуповинной крови в модели без длительного приживания клеток позволяет получать гуманизированных мышей с достаточным для регистрации методом проточной цитометрии количеством ГСК

и созревающих и зрелых лейкоцитарных клеток в костном мозге животных.

Описана экспоненциальная зависимость от дозы острого внешнего  $\gamma$ -облучения для выживаемости ГСК и линейная зависимость для лейкоцитарных CD45<sup>+</sup> клеток человека на 3-и сутки после облучения во всех трех моделях; линейная зависимость от дозы относительного количества ГСК человека на 14-е сутки после облучения. Показано, что полученные в разных моделях зависимости не отличаются друг от друга и позволяют рассчитать схожие значения  $D_0$  для ГСК человека. Все величины  $D_0$  совпадают с литературными данными, приводящим значение  $D_0$  для ГСК человека в пределах 1 Гр [22], что указывает на пригодность моделей для оценки острой реакции ГСК человека на облучение.

Дозозависимое снижение числа ГСК у гуманизированных мышей было описано ранее другими авторами, однако ранее не оценивали восстановление ГСК у гуманизированных мышей спустя длительное время после облучения [23]. В нашей работе для моделей, описывающих зависимость от дозы выживаемости клеток человека на 3-и сутки после облучения, получены более высокие уровни значимости, чем для моделей, описывающих зависимость от дозы числа клеток на 14-е сутки, в период восстановления. Таким образом, радиационно-индуцированная гибель стволовых CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup> и созревающих и зрелых CD45<sup>+</sup> клеток определяется в большей степени дозой, нежели индивидуальными отличиями клеток от разных доноров, в то время как последующее восстановление ГСК и CD45<sup>+</sup> клеток зависит от дозы в меньшей степени и, вероятно, может определяться индивидуальной вариабельностью.

Эти индивидуальные особенности успеха восстановления числа ГСК и CD45<sup>+</sup> клеток после облучения было предложено отразить в интегральном показателе, представляющем собой отношение доли ГСК от всех лейкоцитарных клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому показателю на 3-и сутки после облучения (коэффициент  $K_{14/3}$ ). Коэффициент отражает как радиационно-индуцированную гибель стволовых клеток на 3-и сутки после облучения, так и успешность их пролиферации и дифференцировки на 14-е сутки после облучения, и связан с выживаемостью ГСК и их репопуляцией. У гуманизированных мышей во всех трех моделях этот коэффициент имел четкую обратную зависимость от дозы, что позволяет использовать его для оценки выраженности реакции на облучение. Снижение

$K_{14/3}$  с дозой, существенные различия этого показателя у мышей с разной радиочувствительностью, повышение коэффициента в модели индуцированной цистеамином радиорезистентности у гуманизированных мышей указывает на то, что коэффициент может быть использован для описания биологической реакции кроветворной ткани на облучение, и что более низкие значения показателя ассоциированы с более выраженным влиянием ионизирующего излучения.

Ассоциация более высокого значения  $K_{14/3}$  с меньшими уровнями дозы и с более высокой радиорезистентностью может быть связана с более эффективной репопуляцией ГСК после облучения, более высоким пролиферативным потенциалом и более эффективным восстановлением пула стволовых клеток до того, как будут запущены процессы дифференцировки, созревания CD45<sup>+</sup> клеток [7].

На основании сходства полученных в трех моделях зависимостей от дозы для выживаемости ГСК человека и коэффициента  $K_{14/3}$  можно заключить, что модель с внутрикостным введением ГСК немобилизованной периферической крови мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом может быть использована для оценки реакции ГСК на острое внешнее  $\gamma$ -облучение. В модели регистрируются индивидуальные отличия, касающиеся в основном разной способности восстанавливать пул ГСК и количество созревающих CD45<sup>+</sup> клеток через 14 сут. после облучения.

Предложенный для анализа в данной модели коэффициент  $K_{14/3}$  подвержен индивидуальным вариациям и ассоциирован с радиочувствительностью (чем ниже коэффициент, тем выше радиочувствительность), его оценка в предложенной модели может дать сравнительную характеристику чувствительности реакции гемопоэза отдельных индивидов на радиационное воздействие.

Сохранение и эффективное восстановление пула стволовых клеток может быть важно не только для эффективного восстановления костномозгового кроветворения, но и для снижения риска отдаленных последствий облучения со стороны кроветворной системы. Предложенный способ внутрикостной трансплантации ГСК периферической крови дает широкие возможности для оценки других персонафицированных показателей стволовых клеток человека: экспрессии генов, клоногенной активности, спектра дифференцировки ГСК и других параметров, изменяющихся после воздействия ионизирующего излучения [8, 24, 25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что внутрикостное введение ГСК периферической крови иммунодефицитным мышам может быть эффективно использовано для оценки реакции ГСК человека на радиационное воздействие. При этом анализ относительного числа ГСК (CD34<sup>+</sup> клеток) и их потомков (CD45<sup>+</sup>) позволяет оценивать процессы радиационно-индуцированной гибели и восстановления ГСК. Предложено использование коэффициента, рассчитанного как отношение доли ГСК среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей на 14-е сутки к доле ГСК на 3-и сутки после облучения, для сравнительной оценки радиочувствительности человека.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по государственному заданию ФМБА России, регистрационный N НИОКТР АААА-А20-120120790018-9.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Applegate K.E., Rühm W., Wojcik A. et al. Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat. Environ. Biophys.* 2020;59(2):185–209. <https://doi.org/10.1007/s00411-020-00837-y>
- Human radiosensitivity. Report of the independent advisory group on ionising radiation documents of the Health Protection Agency. London. 2013. 164 p.
- Radiation Protection N°171 Individual radiosensitivity / EU Scientific Seminar 2011. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2012. 71 p.
- Ferlazzo M.L., Bourguignon M., Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review. *Semin. Radiat. Oncol.* 2017;27(4):310–315. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.003>
- Kišonas J., Venius J., Sevriukova O. et al. Individual radiosensitivity as a risk factor for the radiation-induced acute radiodermatitis. *Life.* 2022;12(1):20. <https://doi.org/10.3390/life12010020>
- Brzozowska K., Pinkawa M., Eble M.J. et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2012;88:405–413.
- ICRP Statement on tissue reactions / Early and late effects of radiation in normal tissues and organs — Threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. ICRP Publication 118. Ann. ICRP 41(1/2). 2012. 322 p.
- Shao L., Luo Y., Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014;20(9):1447–1462. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5635>
- Fliedner T.M., Graessle D.H. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat. Environ. Biophys.* 2008;47:63–69. <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0148-6>
- Hoehn D., Pujol-Canadell M., Young E.F. et al. Effects of high- and low-LET radiation on human hematopoietic system reconstituted in immunodeficient mice. *Radiat. Res.* 2019;191(2): 162–175. <https://doi.org/10.1667/RR15148.1>
- Ghandhi S.A., Smilenov L., Shuryak I. et al. Discordant gene responses to radiation in humans and mice and the role of hematopoietically humanized mice in the search for radiation biomarkers. *Sci. Rep.* 2019;9(1):19434. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55982-2>
- Tsogbadrakh B., Jung J.A., Lee M. et al. Identifying serum miRNA biomarkers for radiation exposure in hematopoietic humanized NSG-SGM3 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022;599:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.010>
- Kato K., Omori A., Kashiwakura I. Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. *J. Radiol. Prot.* 2013;33(1):71–80. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/33/1/71>
- Worley J.R., Parker G.C. Effects of environmental stressors on stem cells. *World J Stem Cells.* 2019;11(9):565–577. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i9.565>
- Golebiewska A., Hau A.C., Oudin A. et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. *Acta Neuropathol.* 2020;140(6):919–949. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02226-7>
- Ilmer M., Berger M. Avatars to personalized medicine: of mice and men. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2017;6(5):347–349. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2017.06.05>
- Yao L.C., Aryee K.E., Cheng M. et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immunoncology. *Meth. Mol. Biol.* 2019;1953:241–252. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_15)
- Ito R., Takahashi T., Ito M. Humanized mouse models: application to human diseases. *J. Cell Physiol.* 2018;233(5):3723–3728.
- Walcher L., Hilger N., Wege A.K. et al. Humanized mouse model: hematopoietic stemcell transplantation and tracking using short tandem repeat technology. *Immun. Inflamm. Dis.* 2020;8(3):363–370. <https://doi.org/10.1002/iid3.317>
- Атаманюк Н.И., Стяжкина Е.В., Обвинцева Н.А. и др. Кинетика гибели и восстановления клеток костного мозга у мышей двух линий с разной радиочувствительностью после острого  $\gamma$ -облучения. *Вопр. радиац. безопасности.* 2021;104(4):62–72. [Atamanyuk N.I., Styazhkina E.V., Obvintseva N.A. et al. Kinetics of bone marrow cell death and recovery in two mice strains with different radiosensitivity after acute gamma radiation exposure. *J. Radiat. Safety Issues.* 2021;104(4):62–72. (In Russ.)]
- Атаманюк Н.И., Пряхин Е.А., Андреев С.С. и др. Использование ксенотрансплантации гемопоэтических клеток человека, выделенных из периферической крови взрослых людей и пуповинной крови, иммунодефицитным мышам для изучения действия ионизирующего излучения. *Вопр. радиац. безопасности.* 2021;101(1):72–83. [Atamanyuk N.I., Pryakhin E.A., Andreev S.S. et al. Use of xenotransplantation of human hematopoietic cells isolated from human peripheral blood and umbilical cord blood to immunodeficient mice for

- studying the effect of ionizing radiation. *J. Radiat. Safety Issues*. 2021;101(1):72–83. (In Russ.)]
22. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the radiologist. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019. 1160 p.
23. Wang C., Oshima M., Sashida G. et al. Non-lethal ionizing radiation promotes aging-like phenotypic changes of human hematopoietic stem and progenitor cells in humanized mice. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0132041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132041>.
24. Yoshida K., Satoh Y., Uchimura A. et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci. Rep.* 2022;12 (1):17276. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21621-6>
25. Brojakowska A., Kour A., Thel M.C. et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun. Biol.* 2022;5:828. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>

## Models of Patient Derived Hematopoietic Stem Cell Xenografts for Assessing Individual Human Radiosensitivity

N. I. Atamanyuk\*, E. A. Pryakhin

Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

\*E-mail: [atamanyuk@urcrm.ru](mailto:atamanyuk@urcrm.ru)

There are different approaches to assessing the human individual radiosensitivity. In this study, individual radiosensitivity was assessed in terms of survival and recovery of human hematopoietic stem cells (HSC) after acute gamma irradiation of humanized mice. Immunodeficient NOD SCID mice were transplanted with cord blood HSC intravenously, peripheral or umbilical cord blood HSC intraosseously. The estimated  $D_0$  value for human HSCs was 1.19 Gy (95% CI 0.90 to 1.74), 0.99 Gy (95% CI 0.87 to 1.15), and 0.93 Gy (95% CI 0.61 to 1.91) for the three methods of obtaining humanized mice, respectively. For all three methods of mouse humanization, statistically similar models that describe the dependence of HSC survival on the acute gamma irradiation dose in the range of 0.5–1.5 Gy were obtained. Thus, intraosseous administration of peripheral blood HSCs to immunodeficient mice can be effectively used to assess the response of human HSCs to radiation exposure. Comparison of the HSC number ( $CD34^+$  cells) and their descendants ( $CD45^+$  cells) in non-irradiated and irradiated mice humanized with cells from the same donor on days 3 and 14 after irradiation makes it possible to evaluate the processes of radiation-induced death and recovery of HSCs. A coefficient calculated as the ratio of the proportion of HSCs among all human cells in the bone marrow of humanized mice on the 14th day to the proportion of HSCs on the 3rd day after irradiation was proposed to assess the response to radiation exposure. This coefficient had an inverse linear dependence on the radiation dose, differed in mice with increased and normal radiosensitivity, and increased with the use of the radioprotector cysteamine in humanized mice. We propose to use this coefficient for a comparative assessment of human radiosensitivity.

**Keywords:** individual radiosensitivity, hematopoietic stem cells, xenotransplantation, ionizing radiation, tissue reactions

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Атаманюк Наталья Игоревна (Atamanyuk Natalia Igorevna), [atamanyuk.urcrm.ru](mailto:atamanyuk.urcrm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8293-2730>

Пряхин Евгений Александрович (Pryakhin Evgeny Alexandrovich), <https://orcid.org/0000-0002-5990-9118>

**Вклад авторов:** все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 577.2:575.224.23:612.112:57.085.23:539.1.047

**ОЦЕНКА СТЕПЕНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ  
ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ *IN VITRO***

© 2024 г. О. С. Цымбал<sup>1,\*</sup>, Д. С. Исубакова<sup>1</sup>, Е. В. Брониковская<sup>1</sup>,  
А. Ф. Николаева<sup>2</sup>, В. О. Сигин<sup>2</sup>, А. И. Калинин<sup>2</sup>, В. М. Кириллов<sup>2</sup>,  
Ж. А. Старцева<sup>3</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1,3</sup>, И. В. Мильго<sup>1,4</sup>, Р. М. Тахауов<sup>1,4</sup>

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

Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова Министерства науки  
и высшего образования Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>3</sup>Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>4</sup>Сибирский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

\*E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, olga-tsymbal@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 30.02.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Метилирование ДНК является одним из процессов эпигенетической регуляции генома, который чувствителен к влиянию эндогенных и экзогенных факторов. Воздействие ионизирующего излучения на геном сопровождается изменением степени метилирования ДНК, которое может иметь дозозависимый характер и сохраняться длительное время после радиационного воздействия. Задачей исследования являлась оценка степени метилирования ДНК лимфоцитов крови после однократного воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 1.5 Гр с использованием широкогеномного бисульфитного секвенирования. В исследование было включено десять условно здоровых мужчин — работников объекта использования ионизирующего излучения, не подвергавшихся радиационному воздействию и не страдающих хроническими заболеваниями. Материалом служила цельная кровь: 0 Гр (контрольные образцы) и 1.5 Гр (экспериментальные образцы после воздействия  $\gamma$ -излучения). После облучения с последующим культивированием цельной крови проводили выделение ДНК и бисульфитное секвенирование ограниченных наборов геномных локусов (Reduced representation bisulfite sequencing) с использованием фермента рестрикции XmaI (XmaI-RRBS). Выявлен 41 ген, среди которых 26 генов (*HOXD4*, *PADI2*, *FOXP1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *OR1F1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2* и *ZSCAN10*) имеют тенденцию к гипометилированию ДНК, а 15 генов (*CHRNA4*, *SEPTIN9*, *ZNF174*, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *UR11*, *HBZ*, *KLIF4*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN* и *PAX7*) имеют тенденцию к гиперметилированию ДНК, отмеченных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Таким образом, выявленные в настоящем исследовании гены могут быть перспективными маркерами радиационного воздействия и в дальнейшем использоваться для разработки нового вида биологической дозиметрии — эпигеномной дозиметрии персонала, контактирующего в ходе своей профессиональной деятельности с источниками ионизирующего излучения.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, однократное воздействие  $\gamma$ -излучения, лимфоциты крови, широкогеномное бисульфитное секвенирование (XmaI-RRBS)

**DOI:** 10.31857/S0869803124020021, **EDN:** NBNXKS

В настоящее время широко распространено изучение таких эпигенетических процессов, как метилирование ДНК, которое участвует в регуляции экспрессии генов, в клеточной дифференцировке, репликации, репарации ДНК и других клеточных процессах. Изменение степени метилирования ДНК в составе генов подвержено влиянию эндогенных и

экзогенных факторов. Например, неметилированное состояние CpG-динуклеотидов в промоторной области генов лейкотриеновых рецепторов В4 (*LTB4R* и *LTB4R2*), регулирующих прогрессию опухоли, является потенциальным маркером повышенной инвазивности опухолевых клеток при раке молочной железы [1]. Радиационное воздействие на организм

человека также сопровождается изменением степени метилирования ДНК. Lee Y. и др. (2015) отмечают снижение уровня глобального метилирования ДНК у работников, подвергшихся радиационному облучению при выполнении своих профессиональных обязанностей, по сравнению с контрольной группой [2]. Кузьминой Н.С. и др. (2014, 2016) выявлено aberrантное метилирование CpG-островков промоторов генов клеточного цикла (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*), которое сохраняется в отдаленные сроки после хронического воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в лейкоцитах крови человека [3, 4]. Отмечается дозозависимое гиперметилирование *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1*, которое сохраняется годы и десятилетия после перенесенного пролонгированного внешнего ( $\gamma$ -излучение) и сочетанного ( $\gamma$ - и  $\alpha$ -излучение) облучения [5]. Наши предварительные исследования также выявили связь степени метилирования проапоптического гена *Bak1* с дозой хронического внешнего облучения в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения [6]. Изучение эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов человека после рентгеновского облучения в дозах 0 и 1 Гр также показало связь степени метилирования генов с дозой  $\gamma$ -излучения, при этом CpG-сайты одних генов были гиперметилированы, других — гипометилированы [7].

Таким образом, оценка степени метилирования генов лимфоцитов крови при однократном воздействии  $\gamma$ -излучения является актуальной задачей, которая позволит в дальнейшем выявить маркеры радиационного воздействия, перспективные для биологической дозиметрии персонала, контактирующего с источниками ИИ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследование включало 10 человек мужского пола (20–34 лет) — работников объекта использования ИИ, не подвергавшихся воздействию ИИ и не страдающих хроническими заболеваниями.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

У каждого донора брали добровольное информированное согласие на взятие биоматериала (крови) и обработку персональных данных.

**Материал.** Кровь у доноров забирали из локтевой вены в пробирки Vacuette с Li-гепарином (Greiner Bio-one, Австрия) с иглой Visio Plus для системы Vacuette (Greiner Bio-one, Австрия). Далее кровь от каждого донора разделяли на две части: контрольный (0 Гр) и экспериментальный образцы. Экспериментальные образцы подвергали однократному воздействию  $\gamma$ -излучения *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Облучение крови проводили с помощью  $\gamma$ -терапевтического аппарата Theratron Equinox (Канада), предназначенного для дистанционного облучения. Радиоактивный источник  $^{60}\text{Co}$  (мощность дозы 1.93 Гр/мин,  $E\gamma \approx 1.25$  МэВ). Время от взятия крови до ее облучения с учетом транспортировки образцов составляло не более 1 ч. Контрольные образцы не подвергали облучению (0 Гр), при этом они находились в тех же условиях (транспортировка, температурный режим), что и экспериментальные образцы. Облучение и культивирование контрольных и экспериментальных образцов осуществляли в день взятия крови, после чего оценивали степень метилирования ДНК в лимфоцитах крови.

**Методика.** Культивирование контрольных и экспериментальных образцов цельной крови проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного шкафа Kojair (Финляндия). Кровь в объеме 4 мл смешивали с 16 мл питательной среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), с предварительно добавленным L-глутамином (ПанЭко, Россия), 4 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и 0.4 мл фитогемагглютинаина (ПанЭко, Россия). После чего кровь инкубировали в культуральных флаконах при 37°C в орбитальном шейкере-инкубаторе Biosan Sia (Латвия) в течение 46.5 ч.

После завершения инкубации культуральную суспензию поровну разделяли на 2 пробирки объемом 15 мл, затем центрифугировали 8 мин при 2000 об./мин с использованием центрифуги Eppendorf Centrifuge 5702R (Германия), после культуральную суспензию отмывали физиологическим раствором от гепарина 3 раза. Далее осадок аликвотировали в пробирки типа эппендорф по 700 мкл и замораживали сначала при –20°C, затем при –80°C (в течение 5–6 сут).

Выделение ДНК из лимфоцитов крови проводили с использованием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя, после предварительной промывки замороженных образцов 1-кратным SSC (saline sodium citrate — смесь хлорида натрия и цитрата



натрия). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop-1000 (США).

Степень метилирования ДНК контрольных и экспериментальных образцов определяли методом бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов — RRBS (Reduced representation bisulfite sequencing) с использованием рестриктазы XmaI (метод XmaI-RRBS) [8]. Секвенирование геномных библиотек XmaI-RRBS осуществляли с использованием системы Ion Personal Genome Machine (PGM), наборов для секвенирования Ion PGM 200 Sequencing Kit и Ion 318 Chip (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концент-

рацию ДНК библиотек определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (США).

*Статистические методы.* Данные секвенирования обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения Ion Torrent Suite™. Cutadapt 1.15 применяли для обрезки адаптерных последовательностей, с помощью программного пакета Bismark 0.20 выполняли выравнивание обработанных бисульфитом натрия прочтений и получение данных о метилированных и неметилированных цитозинах. Дифференциально метилированные цитозины отбирали из данных XmaI-RRBS с использованием пакета Reproducibility-Optimized Test Statistic (ROTS) с возможностью парного тестирования [9]. Контроль качества

**Таблица 1.** Средняя частота метилирования CpG-динуклеотидов генов до и после воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 1.5 Гр *in vitro* по крайней мере у 50% исследуемых образцов

**Table 1.** The average frequency of methylation of CpG-dinucleotides of genes before and after exposure to gamma radiation at a dose of 1.5 Gy *in vitro* in at least 50% of the researched samples

Ген	Локализация	Средняя частота метилирования CpG-динуклеотидов		p-value	FDR
		до облучения	после облучения		
<i>HOXD4</i>	downstream	0.6012	0.2008	0.0001	0.6667
<i>PADI2</i>	upstream	0.4844	0.2227	0.0006	0.7391
<i>FOXK1</i>	upstream	0.7021	0.4965	0.0010	0.8018
<i>FTCD</i>	inside intron	0.5681	0.2892	0.0012	0.8018
<i>PRDM16</i>	inside intron	0.4639	0.1592	0.0018	0.8018
<i>TOM1</i>	inside intron	0.7502	0.4582	0.0019	0.8018
<i>PPP1R14A</i>	inside exon	0.4253	0.1842	0.0030	0.8018
<i>FLNB</i>	downstream	0.7349	0.5187	0.0041	0.8018
<i>OR1F1</i>	upstream	0.4176	0.2178	0.0061	0.8018
<i>RARA</i>	inside exon	0.6946	0.4587	0.0082	0.8018
<i>CRTAC1</i>	inside intron	0.6370	0.3819	0.0088	0.8018
<i>AP5B1</i>	inside exon	0.6818	0.4629	0.0090	0.8018
<i>ARL5C</i>	inside intron	0.5196	0.3769	0.0118	0.8018
<i>NOC2L</i>	promoter	0.3271	0.1640	0.0139	0.8018
<i>MAMDC4</i>	inside intron	0.3947	0.1942	0.0149	0.8018
<i>FGFRL1</i>	downstream	0.8622	0.6732	0.0152	0.8018
<i>PPFIA3</i>	inside intron	0.4090	0.1967	0.0243	0.8018
<i>CUX2</i>	inside intron	0.6984	0.4791	0.0245	0.8018
<i>ANKRD20A19P</i>	inside exon	0.5022	0.4306	0.3088	0.8018
<i>FAM83H-AS1</i>	inside intron	0.1853	0.0766	0.0287	0.8018
<i>CBFA2T3</i>	promoter	0.5302	0.3567	0.0296	0.8018
<i>POLN</i>	inside intron	0.8402	0.6919	0.0297	0.8018
<i>MIR4458HG</i>	inside intron	0.2580	0.1316	0.0329	0.8018
<i>FNBP1</i>	inside exon	0.3181	0.1933	0.0364	0.8018
<i>SPIRE2</i>	inside intron	0.5149	0.3188	0.0383	0.8018
<i>ZSCAN10</i>	promoter	0.4170	0.3154	0.0494	0.8018

Гипометилированные гены

Гиперметилированные гены	<i>CHRNA4</i>	inside exon	0.6516	0.9208	0.0003	0.7391
	<i>SEPTIN9</i>	inside intron	0.1502	0.4356	0.0010	0.8018
	<i>ZNF174</i>	downstream	0.4794	0.8072	0.0016	0.8018
	<i>ELK3</i>	inside intron	0.3344	0.6106	0.0021	0.8018
	<i>NFAM1</i>	downstream	0.2933	0.5862	0.0021	0.8018
	<i>ALG10</i>	downstream	0.5457	0.7752	0.0023	0.8018
	<i>SOX8</i>	downstream	0.4407	0.7027	0.0033	0.8018
	<i>KLHL30</i>	inside intron	0.4844	0.7123	0.0070	0.8018
	<i>URI1</i>	downstream	0.7134	0.9268	0.0130	0.8018
	<i>HBZ</i>	downstream	0.8045	0.9215	0.0162	0.8018
	<i>KLF14</i>	inside exon	0.2003	0.4103	0.0193	0.8018
	<i>MYEOV</i>	downstream	0.5093	0.6598	0.0285	0.8018
	<i>MYO16</i>	inside exon	0.3204	0.5519	0.0361	0.8018
	<i>DMKN</i>	inside intron	0.6150	0.7652	0.0436	0.8018
	<i>PAX7</i>	inside intron	0.2057	0.3638	0.0487	0.8018

**Примечание.** Upstream — восходящие нетранслируемые области, promoter — промотор, inside intron — область интрона, inside exon — область экзона, downstream — нисходящие нетранслируемые области. FDR (False discovery rate) — ожидаемая доля ложных отклонений.

**Note.** Upstream — ascending untranslated regions, inside intron — intron region, inside exon — exon region, downstream — descending untranslated regions. FDR — false discovery rate.

обработанных прочтений осуществляли с помощью инструмента FASTQC [10]. Расчеты проводили с использованием статистического языка программирования R 3.6.3 [11]. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene Ontology, далее GO) был выполнен с использованием пакета clusterProfiler с функцией enrichGO. В качестве предельного значения для дифференциально метилированных цитозинов было установлено изменение среднего значения метилирования b-value на  $\pm 0.20$  (20%) между контрольными и экспериментальными образцами. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ широкогеномного бисульфитного секвенирования (XmaI-RRBS) показал, что после облучения образцов *in vitro* в дозе 1.5 Гр CpG-динуклеотиды некоторых генов стремятся либо к гипометилированному, либо к гиперметилированному состоянию, что отмечено по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Выявлен 41 ген, среди которых 26 генов (*HOXD4*, *PADI2*, *FOXK1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *OR1F1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2* и *ZSCAN10*) имеют тенденцию к гипометилированию CpG-динуклеотидов, а 15 генов (*CHRNA4*, *SEPTIN9*,

*ZNF174*, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *URI1*, *HBZ*, *KLF14*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN* и *PAX7*) имеют тенденцию к гиперметилированию CpG-динуклеотидов. В табл. 1 представлены средние частоты метилирования CpG-динуклеотидов 41 гена до и после облучения.

Распределение дифференцированно метилированных цитозинов относительно областей гена (экзонов, интронов, промоторов, восходящих и нисходящих нетранслируемых (некодирующих) областей) у экспериментальных образцов показано на рис. 1. Для цитозинов, которые изменили статус метилирования в CpG-динуклеотидах после воздействия  $\gamma$ -излучения на кровь *in vitro*, гипометилирование ДНК наиболее характерно для восходящих нетранслируемых областей и области промотора, а гиперметилирование ДНК в большей степени характерно для нисходящих нетранслируемых областей.

Было выявлено частичное гиперметилирование после облучения лимфоцитов крови *in vitro* внутри интрона гена *GSTP1* (рис. 2), для которого ранее было показано aberrантное метилирование промоторной области после хронического воздействия ИИ [3, 4].

Анализ обогащения по функциональной принадлежности с использованием GO биологических процессов показал, что гены с гипометилированными CpG-динуклеотидами после облучения

играют роль в положительной регуляции дифференцировки жировых клеток, отрицательной регуляции развития хрящевой ткани, развитии обонятельных луковиц, обонятельных долей и движения на основе актиновых микрофиламентов. Гены с гиперметилированными CpG-динуклеотидами после облучения участвуют в катаболизме

пуриновых рибонуклеотидов, в регуляции дифференцировки миобластов, активации лейкоцитов, а также рецепторов, связанных с G-белками, передаче сигналов с помощью фермента фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и дифференцировке различных клеток. Топ-20 биологических процессов приведен на рис. 3.



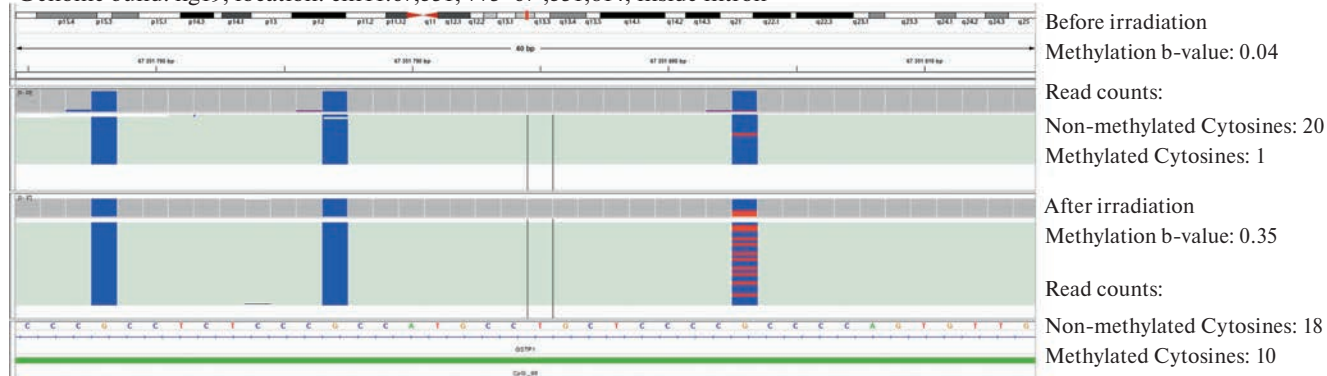
**Рис. 1.** Гистограмма для дифференциально метилированных цитозинов с расположением относительно элементов гена по оси X и подсчетом по оси Y для цитозинов, которые изменили статус метилирования, выявленных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов.

Примечание. Upstream — восходящие нетранслируемые области, promoter — промотор, inside intron — область интрона, inside exon — область экзона, downstream — нисходящие нетранслируемые области.

**Fig. 1.** Annotation barplots for differentially methylated cytosines with location relative to gene elements on x-axis and counts on y-axis for cytosines that changed methylation status detected in at least 50% of the experimental samples. Note. Upstream — ascending untranslated regions, inside intron — intron region, inside exon — exon region, downstream — descending untranslated regions.

#### *GSTPI* abnormal methylation

Genome build: hg19, location: chr11:67,351,775-67,351,814; inside intron



**Рис. 2.** Пример визуализации аномального метилирования ДНК внутри интрона *GSTPI* после облучения лимфоцитов крови *in vitro*, полученный с использованием геномного браузера Integrative Genomic Browser (IGV).

Примечание. На верхней панели показан результат высокопроизводительного параллельного бисульфитного секвенирования образца ДНК до облучения; на нижней панели — после облучения в дозе 1.5 Гр. Каждая дорожка представляет последовательность (считывание) одной молекулы из образца; красный цвет — метилированные цитозины, синий — неметилированные цитозины в контексте CpG. На рисунке представлен фрагмент из 40 пар оснований (chr11:67,351,775-67,351,814); эталонная последовательность генома (hg19 человека) находится внизу. Показанный фрагмент находится в пределах острова *GSTPI* 5'CpG (зеленый).

**Fig. 2.** An example of visualization of abnormal methylation inside intron of the *GSTPI* gene after *in vitro* irradiation of blood lymphocytes obtained using the Integrative Genomic Browser (IGV).

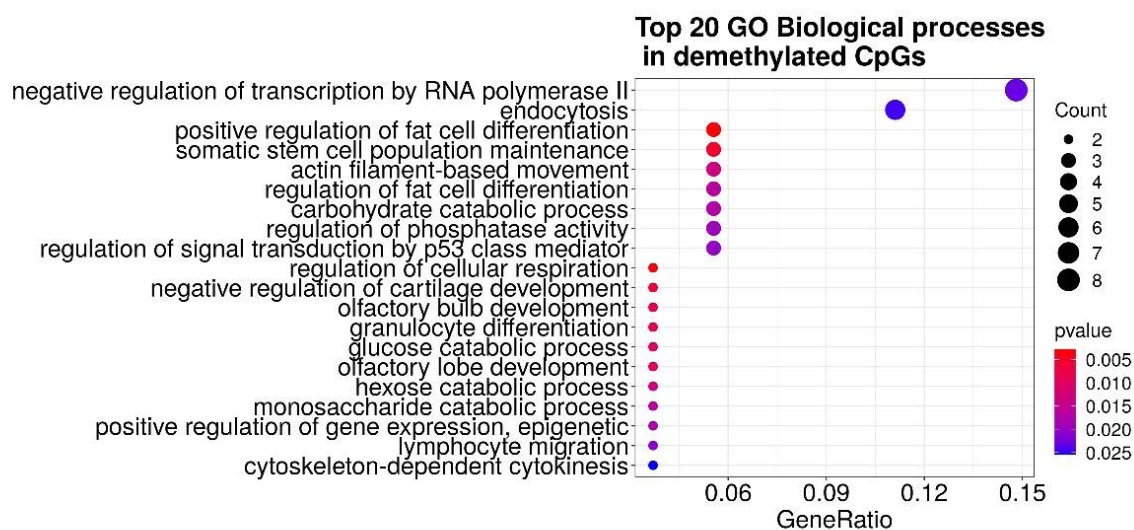
Note. The upper panel shows the result of high-throughput parallel bisulfite sequencing of the DNA sample before irradiation; the bottom panel, the result of DNA sequencing of the sample after irradiation with 1.5 Gy. Each track represents a sequence (read) of a single molecule from the sample; red is for methylated cytosines and blue is for nonmethylated cytosines in the CpG context. A fragment of 40 base pairs (chr11:67,351,775-67,351,814) is presented; the reference genome sequence (Human hg19) is at the bottom. The fragment shown is within the *GSTPI* 5'CpG island (green).

## ОБСУЖДЕНИЕ

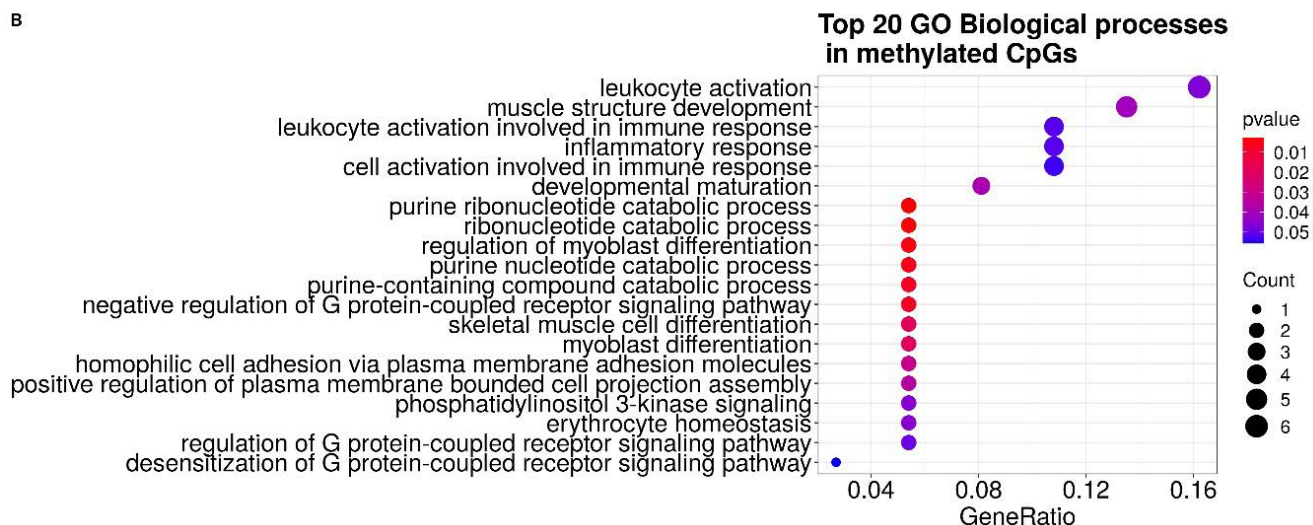
Согласно результатам ХмаI-RRBS изменения степени метилирования CpG-динуклеотидов по крайней мере у 50% образцов после однократного воздействия  $\gamma$ -излучения выявлены гены, которые участвуют в важных клеточных процессах: транскрипция, апоптоз, аутофагия, пролиферация и др. Например, *FOXP1* (forkhead box K1), гипометилированный после облучения, участвует в индукции аутофагической гибели в ответ на повреждение ДНК; белки FOXP (FOXP1 и FOXP2) функционируют как супрессоры транскрипции [12]. Гипометилирование *FOXP1* отмечается в гепатоцитах,

при гепатоцеллюлярной карциноме человека [13]. Также отмечается снижение степени метилирования этого гена с возрастом [14, 15]. Другой ген, имеющий тенденцию к гипометилированию CpG-динуклеотидов, *CBFA2T3* (CBFA2/RUNX1 partner transcriptional co-repressor 3), участвует в ингибировании дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза [16]. Гипометилирование *FOXP1* и *CBFA2T3* наблюдается после облучения культуры иммортализованных эпителиоцитов бронхов человека в дозе 1 Гр [7]. *AP5B1* (adaptor related protein complex 5 subunit beta 1) принимает участие в аутофагии и внутриклеточном транспорте [17].

A



B



**Рис. 3.** Топ-20 биологических процессов онтологии генов (GO) с представленностью (количество входных генов в процессе / количество всех входных генов) по оси X и терминами GO по оси Y в гипометилированных (А) и в гиперметилированных (Б) CpG-динуклеотидах, выявленных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Примечание. Count — число выявленных генов, которые участвуют в биологическом процессе.

**Fig. 3.** Top 20 enriched Gene Ontology (GO) Biological processes terms with GeneRatio (Num. of genes in process/Num. of total input genes) on X-axis and GO terms on Y-axis in CpGs demethylated (A) and CpGs hypermethylated (B) detected in at least 50% of the experimental samples.

Note. Count — the number of identified genes that are involved in the biological process.

Гиперметилирование CpG-динуклеотидов, выявленное по крайней мере у 50% облученных образцов, наблюдалось у *HBZ* (hemoglobin subunit zeta), который участвует в миграции и пролиферации клеток при Т-клеточном лейкозе [18]. Отмечалась также тенденция к снижению экспрессии *HBZ* после воздействия “малых” (150 мГр) доз ИИ [19].

Дифференцированно метилированные цитозины у экспериментальных образцов распределены неравномерно относительно областей гена. Наиболее характерно гипометилирование CpG-динуклеотидов в области промотора (рис. 1). Исследование Kennedy E.M. и др. (2018) показало, что облучение рентгеновским излучением (1 Гр) эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов человека приводит в большей степени к гипометилированию, чем к гиперметилированию CpG-сайтов. При этом гипометилирование происходило, в первую очередь, в более высоко метилированных CpG-сайтах. Помимо этого, выявлено, что воздействие рентгеновского излучения отражается в основном на транскрибируемой области гена, в меньшей степени — на активных/доступных промоторах и энхансерах [7]. Снижение степени метилирования генов было обнаружено после воздействия ИИ на лимфоциты человека в дозе 2 Гр [20]. После радиационного воздействия (2 и 5 Гр) на опухолевые клетки при раке толстой кишки наблюдалось гипометилирование промоторных областей и увеличение экспрессии генов (*ANGPT1*, *APBB2*, *CHGA*, *CTGF*, *IFI6*, *IGLON5*, *SLC43A2*) [21]. Воздействие  $\gamma$ -излучения в дозе 7 Гр на клетки менингиомы человека приводило к гипометилированию промотора и увеличению экспрессии урокиназного активатора плазминогена (urokinase plasminogen activator, uPA), также наблюдалось снижение экспрессии ДНК-метилтрансферазы 1 (*DNMT1*) [22]. В свою очередь, в других исследованиях отмечалось гиперметилирование ДНК в промоторной области генов. Гиперметилирование CpG-островков промоторов генов было выявлено Кузьминой Н.С. и др. (2016, 2017, 2018) при хроническом воздействии ИИ на организм человека [4, 23, 24]. Повышение степени метилирования промоторной области гена клеточного цикла *CCND2* отмечалось Chen X. и др. (2015) в радиационно устойчивых клетках плоскоклеточного рака [25]. Таким образом, гипо- или гиперметилирование промоторной области генов, вероятно, зависит от типа клеток, способа и продолжительности радиационного воздействия.

Частичное гиперметилирование ДНК лимфоцитов крови после воздействия  $\gamma$ -излучения *in vitro* было обнаружено внутри интрона гена *GSTP1* (рис. 2). Белки *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) являются членами семейства ферментов глутатион-S-трансферазы (GSTs), которые играют важную роль в детоксикации, катализируя конъюгацию многих гидрофобных и электрофильных соединений с восстановленным глутатионом. Гиперметилирование этого гена было обнаружено в опухолевых клетках предстательной железы [26, 27]. Mian O.Y. и др. (2016) показали, что длительное воздействие “малых” доз ИИ приводит к снижению активности *GSTP1*, что способствует выживанию опухолевых клеток при раке предстательной железы [28]. Исследование Кузьминой Н.С. и др. (2014, 2018, 2019) показало, что хроническое воздействие  $\gamma$ -излучения на организм человека (на примере ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС) приводит к aberrантному гиперметилированию CpG-островков промотора *GSTP1* лейкоцитов крови [3, 5, 24]. Помимо этого, было отмечено сохранение aberrантного гиперметилирования *GSTP1* в течение длительного времени после облучения [3, 24] и зависимость степени метилирования этого гена от дозы  $\gamma$ -излучения [5]. Таким образом, наше исследование подтверждает ранее полученные результаты в отношении метилирования гена *GSTP1*.

Анализ обогащения по функциональной принадлежности биологических терминов GO генов, имеющих гипометилированные цитозины в экспериментальных образцах, показал связь с процессами дифференцировки клеток, развитием, миграцией лимфоцитов, положительной эпигенетической регуляцией экспрессии генов и др. Примечательно гипометилирование цитозинов генов, связанных с аутофагической гибелью и апоптозом, которые могут определять стимуляцию этих процессов после облучения ИИ для восстановления и элиминации нерепарируемых поврежденных клеток. Гиперметилированные после облучения ИИ цитозины генов, которые согласно анализу обогащения по функциональной принадлежности биологических терминов GO, связаны с процессами передачи внутриклеточных сигналов, катаболическими процессами, воспалительным и иммунным ответами, соответственно, могут обуславливать торможение этих процессов после радиационного воздействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были выявлены гены, которые имели тенденцию к гипометилированию (26 генов) и гиперметилированию (15 генов) CpG-динуклеотидов после однократного облучения образцов крови *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Данные гены могут стать потенциальными кандидатами для изучения влияния ИИ на внутриклеточные и организменные процессы, а также могут быть перспективными маркерами для эпигеномной дозиметрии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность медицинским физикам отделения лучевой терапии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра И.А. Милойчиковой и Н.Д. Тургуновой за помощь в облучении биоматериала (крови).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке Федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2035 года”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинин А.И., Сигин В.О., Немцова М.В. и др. Аномальное деметилирование и эктопическая экспрессия генов лейкотриеновых рецепторов LTB4R/LTB4R2 при раке молочной железы. *Мед. генетика*. 2021;20(8):21–30. [Kalinkin A.I., Sigin V.O., Nemtsova M.V. et al. Abnormal demethylation and ectopic expression of leukotriene receptors genes LTB4R/LTB4R2 in breast cancer. *Medical Genetics*. 2021;20(8):21–30. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2021.08.21-30>
2. Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015;91(2):142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
3. Кузьмина Н.С., Мязин А.Е., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014;54(2):127–139. [Kuzmina N.S., Myazin A.E., Lapteva N.S., Rubanovich A.V. Study of aberrant methylation in blood leukocytes of liquidators of the chernobyl accident. *Radiat. Biology. Radioecology*. 2014;54(2):127–139. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803114020064>
4. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* 2016;146:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
5. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся облучению в результате профессиональной деятельности: Мат. Рос. конф. с междунар. участием “Современные проблемы радиационной генетики”. Дубна, 2019. Дубна: Изд-во Объединенный институт ядерных исследований, 2019. С. 76–78. [Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to radiation. Materials of the Russian conference with international participation “Modern problems of radiation genetics”: Conf. proc. Dubna, 2019. Dubna: Izd-vo Joint Institute for Nuclear Research, 2019. P. 76–78. (In Russ.)].
6. Цымбал О.С., Исубакова Д.С., Брониковская Е.В. и др. Роль метилирования *Bak1* в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2020;65(5):29–34. [Tsymbal O.S., Isubakova D.S., Bronikovskaya E.V., et al. The role of *Bak1* methylation in the induction of chromosomal aberrations under chronic low-intensity external radiation. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(5):29–34. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-29-34>
7. Kennedy E.M., Powell D.R., Li Z. et al. Galactic cosmic radiation induces persistent epigenome alterations relevant to human lung cancer. *Sci. Rep.* 2018;8(1):6709. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24755-8>
8. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing. *Epigenomics*. 2017;9(6): 833–847. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0031>
9. Suomi T., Seyednasrollah F., Jaakkola M.K. et al. ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing. *PLoS Comput. Biol.* 2017;13(5):e1005562. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005562>
10. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed October 19, 2022.
11. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2020. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed December 20, 2022.
12. Chen Y., Wu J., Liang G. et al. CHK2-FOXK axis promotes transcriptional control of autophagy programs. *Sci. Advances*. 2020;6(1):eaax5819. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5819>
13. Cao H., Chu X., Wang Zh. et al. High FOXK1 expression correlates with poor outcomes in hepatocellular carcinoma and regulates stemness of hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci.* 2019;228:128–134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.068>
14. Atsem St., Reichenbach J., Potabattula R. et al. Paternal age effects on sperm FOXK1 and KCNA7 methylation and transmission into the next generation. *Hum. Mol. Genet.* 2016;25(22):4996–5005. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw328>
15. Reichenbach J.R. Paternal age effects on sperm DNA methylation and its impact on the next generation.

- [dissertation for Doctoral] Würzburg; 2020. 106 p. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/339375571\\_Paternal\\_age\\_effects\\_on\\_sperm\\_DNA\\_methylation\\_and\\_its\\_impact\\_on\\_the\\_next\\_generation](https://www.researchgate.net/publication/339375571_Paternal_age_effects_on_sperm_DNA_methylation_and_its_impact_on_the_next_generation) Accessed February 2, 2023.
16. Steinauer N., Guo Ch., Zhang J. The transcriptional corepressor CBFA2T3 inhibits all-trans-retinoic acid-induced myeloid gene expression and differentiation in acute myeloid leukemia. *J. Biol. Chem.* 2020;295(27):8887–8900. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013042>
  17. Calender A., Farnier P.A.R., Buisson A. et al. Whole exome sequencing in three families segregating a pediatric case of sarcoidosis. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(1):23. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0338-x>
  18. [Matsuoka M. Mechanism of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2010;37(1):10–13. (in Japan.)].
  19. [Fang F., Yu X.L., Niu D.S., Li J. Screening of candidate genes related to low-dose ionizing radiation based on transcriptome-proteome correlation research techniques. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases.* 2021;39(10):738–743. (in Chinese)]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121094-20200518-00267>
  20. Chaudhry M.A., Omaruddin R.A. Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):908–916. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1509>
  21. Bae J.-H., Kim J.-G., Heo K. et al. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer. *BMC Genomics.* 2015;16(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1229-6>
  22. Velpula K.K., Gogineni V.R., Nalla A.K. et al. Radiation-induced hypomethylation triggers urokinase plasminogen activator transcription in meningioma cells. *Neoplasia.* 2013;15(2):192–203. <https://doi.org/10.1593/neo.121334>
  23. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2017;54(4):341–356. [Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G., et al. Hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans in the remote period after radiation exposure. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2017;54(4):341–356. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803117040014>
  24. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al. Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure – Validation set. *Environ. Pollut.* 2018;234:935–942. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.039>
  25. Chen X., Liu L., Mims J. et al. Analysis of DNA methylation and gene expression in radiation-resistant head and neck tumors. *Epigenetics.* 2015;10(6):545–561. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1048953>
  26. Zhao F., Olkhov-Mitsel E., van der Kwast T. et al. Urinary DNA methylation biomarkers for noninvasive prediction of aggressive disease in patients with prostate cancer on active surveillance. *J. Urology.* 2017;197(2):335–341. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.08.081>
  27. Patel P.G., Wessel Th., Kawashima A. et al. A three-gene DNA methylation biomarker accurately classifies early stage prostate cancer. *Prostate.* 2019;79(14):1705–1714. <https://doi.org/10.1002/pros.23895>
  28. Mian O.Y., Khattab M.H., Hedayati M. et al. GSTP1 Loss results in accumulation of oxidative DNA base damage and promotes prostate cancer cell survival following exposure to protracted oxidative stress. *Prostate.* 2016;76(2):199–206. <https://doi.org/10.1002/pros.23111>

## Assessment of the Degree Of Dna Methylation in Lymphocytes after a Single Blood Irradiation *in vitro*

**O. S. Tsybal<sup>1,\*</sup>, D. S. Isubakova<sup>1</sup>, E. V. Bronikovskaya<sup>1</sup>,  
A. F. Nikolaeva<sup>2</sup>, V. O. Sigin<sup>2</sup>, A. I. Kalinkin<sup>2</sup>, V. M. Kirillov<sup>2</sup>,  
Zh. A. Startseva<sup>3</sup>, N. V. Litviakov<sup>1,3</sup>, I. V. Milto<sup>1,4</sup>, R. M. Takhauov<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Seversk Biophysical Research Center  
of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russia

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Tomsk National Research Medical Center

of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>4</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

\*E-mail: [mail@sbrc.seversk.ru](mailto:mail@sbrc.seversk.ru), [olga-tsybal@mail.ru](mailto:olga-tsybal@mail.ru)

DNA methylation is one of the processes of epigenetic regulation of the genome, which is sensitive to the influence of endogenous and exogenous factors. The effect of ionizing radiation on the genome is accompanied by a change in the degree of DNA methylation, which can be dose-dependent and persist for a long time after radiation exposure. The objective of the study was to assess the degree of DNA methylation of blood lymphocytes after a single exposure to gamma radiation at a dose of 1.5 Gy using wide-genome bisulfite sequencing. The study included 10 conditionally healthy male employees of the ionizing radiation facility who were not exposed to radiation and

did not suffer from chronic diseases. The material was whole blood: 0 Gy (control samples) and 1.5 Gy (experimental samples irradiated with gamma radiation). After irradiation with subsequent cultivation of whole blood, DNA isolation and bisulfite sequencing of limited sets of genomic loci (Reduced representation bisulfite sequencing) was performed using XmaI restriction enzyme (XmaI-RRBS). 41 genes were identified, including 26 genes (*HOXD4*, *PADI2*, *FOKK1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *ORIF1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2*, and *ZSCAN10*) have a tendency to hypomethylation DNA, and another 15 genes (*CHRNA4*, *SEPTIN9*, *ZNF174*, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *UR11*, *HBZ*, *KLF14*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN*, and *PAX7*) tend to have hypermethylated state detected in at least 50% of the experimental samples. Thus, the genes identified in this study can be promising markers of radiation exposure and, in the future, be used to develop a new type of biological dosimetry – epigenomic dosimetry of personnel in contact with ionizing radiation sources in the course of their professional activities.

**Keywords:** DNA methylation, single exposure to gamma radiation, blood lymphocytes, genome-wide bisulfite sequencing (XmaI-RRBS)

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Цымбал Ольга Сергеевна (Tsybal Olga Sergeevna),  
olga-tsybal@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2311-0451>

Исубакова Дарья Сергеевна (Isubakova Daria Sergeevna),  
isubakova.daria@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5032-9096>

Брониковская Евгения Владимировна (Bronikovskaya  
Evgenia Vladimirovna), Bronikev@gmail.com

<https://orcid.org/00000-0002-6486-5025>

Николаева Александра Фёдоровна (Nikolaeva Alexandra  
Fedorovna), alex.ru97@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3805-8879>

Сигин Владимир Олегович (Sigin Vladimir Olegovich),  
sigin.vladimir@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8020-3577>

Калинкин Алексей Игоревич (Kalinkin Alexey Igorevich),  
alexeika2@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9215-4581>

Кириллов Владимир Михайлович (Kirillov Vladimir  
Mikhailovich), 96vladkiri96@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-8762-1322>

Старцева Жанна Александровна (Startseva Zhanna  
Alexandrovna), zhanna.alex@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>

Литвяков Николай Васильевич (Litviakov Nicolay  
Vasilievich), nvlitv72@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Мильто Иван Васильевич (Milto Ivan Vasilievich),  
milto\_bio@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

Тахауов Равиль Манихович (Takhauov Ravil Mani-  
khovich), niirm2007@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1994-957X>

**Вклад авторов.** Цымбал О.С. — сбор и обработка био-материала, литературный обзор, подготовка текста статьи. Исубакова Д.С., Брониковская Е.В. — сбор и обработка биоматериала. Николаева А.Ф., Кириллов В.М. — проведение широкогеномного бисульфитного секвенирования (XmaI-RRBS). Калинкин А.И., Сигин В.О. — анализ и интерпретация данных. Литвяков Н.В. — разработка концепции и дизайна исследования. Старцева Ж.А. — планирование и организация дистанционного облучения биоматериала. Мильто И.В. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование. Тахауов Р.М. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.



== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]::575.174.015.3:575.224.23:612.112.94:613.648:539.1.047

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *WNT*  
С ЧАСТОТОЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ  
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

© 2024 г. Д. С. Исубакова<sup>1,\*</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1,2</sup>, О. С. Цымбал<sup>1</sup>, Т. В. Вишневская<sup>1</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>Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия  
\*E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, isubakova.daria@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Представлены результаты изучения связи однонуклеотидных полиморфизмов генов *WNT* с повышенной частотой цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения, подвергавшихся длительному радиационному воздействию в дозах 100–500 мГр. Объектом исследования служила кровь 95 условно здоровых работников, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения в дозах от 100 до 500 мГр. Для всех обследованных лиц проводили стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов крови. Геномную ДНК из лимфоцитов крови работников выделяли с помощью набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия). Генотипировали ДНК по 116 однонуклеотидным полиморфизмам генов *WNT* с помощью чипов (ДНК-чипы) высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США). С учетом поправки Бонферрони установлена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов *WNT* с высокой частотой кольцевых хромосом в лимфоцитах крови, все остальные типы цитогенетических нарушений не показали статистической значимости. В результате проведенного исследования выявлен однонуклеотидный полиморфизм гена *WNT9B rs1530364*, который может рассматриваться в качестве потенциального маркера повышенного уровня индивидуальной радиочувствительности организма человека.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, хромосомные aberrации, однонуклеотидный полиморфизм, микроматричный анализ

DOI: 10.31857/S0869803124020037, EDN: NBMXQB

Семейство генов *WNT* состоит из девятнадцати структурно родственных генов, которые обеспечивают экспрессию белков, расположенных в разных аутосомах [1]. WNT-белки связываются с мембранными рецепторами и тем самым активируют внутриклеточные сигнальные пути – WNT-сигнальные пути [2]: канонический (зависимый от  $\beta$ -катенина) и неканонический (независимый от  $\beta$ -катенина). Взаимодействие между WNT-белками и рецепторами плазмолеммы может приводить к множеству внутриклеточных ответов [3, 4].

С радиационно-индуцированным клеточным ответом связывают именно канонический сигнальный путь [5–10]. Активация WNT-сигнального пути после воздействия ионизирующим излучением (ИИ)

приводит к диссоциации протеасомного комплекса, что влечет за собой накопление  $\beta$ -катенина в цитоплазме с последующим ингибированием апоптоза [11]. Основные механизмы этого радиационно-индуцированного WNT/ $\beta$ -катенин-зависимого клеточного ответа все еще остаются неясными, и лишь в нескольких исследованиях были идентифицированы регуляторы [6, 12], ответственные за радиопротекторный эффект WNT-белков.

Важно отметить, что в случае хронического воздействия ИИ повреждение хромосом и мембран происходит на фоне компенсаторно-адаптивных механизмов и в значительной степени может быть изменено различными факторами (антиоксиданты, простагландины, белки теплового шока,

факторы роста, белки системы репарации ДНК и др.) [13, 14]. Несмотря на многочисленность факторов, анализ генетических эффектов действия ИИ остается одним из наиболее перспективных направлений исследования механизмов формирования индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ).

Индивидуальная радиочувствительность обладает многокомпонентным содержанием, но в существенной степени обуславливается генетическими особенностями. Среди них значительную роль играют однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) генов различных систем клеточной защиты (например, апоптоза, системы репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков и др.) [15, 16]. Система *WNT* играет значительную роль во многих клеточных процессах и для декомпозиции ассоциации клеточных систем с цитогенетическими нарушениями (ЦН) и ИРЧ необходимо детальное изучение каждого компонента системы.

Цель исследования — оценить связь ОНП генов системы *WNT* с повышенной частотой ЦН, возникших у работников объекта использования ИИ (ОИИИ) под действием долговременного техногенного профессионального облучения ИИ в диапазоне доз 100–500 мГр.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В исследовании использовали цельную венозную кровь 77 условно здоровых работников ОИИИ, не подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности облучению ИИ — группа контроля, и 95 условно здоровых работников ОИИИ, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному облучению ИИ ( $\gamma$ -излучение) в дозах от 100 до 500 мГр — группа исследования.

Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1.

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 1964 г. (с изменениями 1975–2008 гг.). Все доноры подписали информированное добровольное согласие. Сбор и уточнение информации о донорах биологического материала реализованы с применением базы данных медико-дозиметрического регистра персонала ОИИИ, а также архива медицинской документации СБН Центра, содержащего медицинскую информацию обо всех работниках ОИИИ [17]. Процедуры взятия крови и цитогенетического исследования детально описаны нами ранее и не претерпели трансформаций [18].

**Таблица 1.** Характеристика обследованных групп работников ОИИИ

**Table 1.** Characteristics of the surveyed groups of workers object of use of ionizing radiation

Показатель		Группа контроля	Группа исследования
Количество		77	95
Мужчины/женщины		38/39	95/0
Возраст, лет	$M \pm SE$	$57.31 \pm 1.64$	$62.95 \pm 0.99$
Стаж работы, лет	$M \pm SE$	$23.62 \pm 1.53$	$34.12 \pm 1.01$
Доза $\gamma$ -излучения, мГр	$M \pm SE$	–	$220.84 \pm 10.06$
	Median	–	181.50
	$Q_1-Q_3$	–	151.22–289.36

Примечание. *M* — среднее арифметическое, *SE* — ошибка среднего арифметического, Median — медиана,  $Q_1-Q_3$  — интерквартильный размах.

Определяли следующие виды ЦН: aberrантные клетки, полиплоидные клетки, мультиaberrантные клетки (более пяти хромосомных aberrаций), хромосомные и хроматидные фрагменты, кольцевые и дицентрические хромосомы, хроматидные обмены (фигуры типа “крест”) и транслокации.

ДНК выделяли из лимфоцитов крови с использованием набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия). Чистоту ( $A_{260}/A_{280} = 1.80-2.00$ ,  $A_{260}/A_{230} = 1.90-2.15$ ) и концентрацию (50–150 нг/мкл) ДНК устанавливали на спектрофотометре EzDrop-1000 (BlueRay Biotech, Тайвань). Целостность ДНК определяли с помощью капиллярного электрофореза — фрагменты ДНК имели размер более 48 кб.

Изученные ОНП генотипированы на ДНК-чипах Cyto Scan™ HD Array (Affymetrix, США). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя. Обработку результатов микрочипового исследования проводили с применением программы Chromosome Analysis Suite 4.3 (Affymetrix, США). Для уточнения и идентификации ОНП и генов, к которым они принадлежат, в работе были использованы базы данных NCBI, OMIM и GWAS Catalog, SNPedia.

При анализе данных исключены ОНП любого генотипа при  $n < 5$ , поскольку в условиях мало-численной выборки это увеличивает вероятность ошибки первого рода. Из дальнейшего анализа исключили также ОНП, не соответствующие равновесию Харди–Вайнберга. В результате из 116 ОНП в окончательный статистический анализ был включен 51 ОНП.

Анализ данных генотипирования на каждый из изученных ОНП проводили по четырем моделям: аддитивной, рецессивной, доминантной и сверхдоминантной. По аддитивной модели оценивали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному аллелю, носителями гомозиготными по рецессивному аллелю и гетерозиготными носителями. По рецессивной модели устанавливали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному аллелю и гетерозиготными носителями, с одной стороны, и носителями гомозиготными по рецессивному аллелю — с другой. По доминантной модели определяли различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по рецессивному аллелю и гетерозиготными носителями с одной стороны, и носителями гомозиготными по доминантному аллелю — с другой. При сверхдоминантной модели устанавливали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному и рецессивному аллелю с одной стороны и гетерозиготными носителями с другой.

*Статистические методы.* Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, США). 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 ЦН применяли критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате рутинного цитогенетического анализа лимфоцитов крови установлены частоты ЦН у работников ОИИИ обеих групп. Результаты представлены в табл. 2.

Согласно данным из табл. 2, большая часть типов ЦН, не являющихся маркерами радиационного воздействия, в группе контроля и группе исследования не отличаются. Это является следствием того, что большинство обследованных работников ОИИИ проживают и работают в аналогичных

**Таблица 2.** Сравнение частот ЦН у работников ОИИИ группы контроля и группы исследования

**Table 2.** Comparison of the frequencies of cytogenetic disorders in workers object of use of ionizing radiation of the control group and the research group

Тип ЦН	Частота ЦН на 100 клеток $M \pm SE$		<i>p</i>
	Группа контроля, $n = 77$	Группа исследования, $n = 95$	
Аберрантные клетки	1.7817 ± 0.1585	2.9114 ± 0.1983	<b>0.0000</b>
Хроматидные фрагменты	0.5939 ± 0.0677	0.9215 ± 0.1144	0.0550
Хромосомные фрагменты	0.5030 ± 0.0622	0.7526 ± 0.0988	0.2012
Кольцевые хромосомы	0.0717 ± 0.0186	0.2205 ± 0.0305	<b>0.0010</b>
Дицентрические хромосомы	0.5666 ± 0.0715	0.9478 ± 0.0965	<b>0.0105</b>
Мультиаберрантные клетки	0.0258 ± 0.0147	0.0163 ± 0.0072	0.9987
Хроматидные обмены	0.0466 ± 0.0169	0.0758 ± 0.0183	0.4570
Транслокации	0.0043 ± 0.0043	0.0069 ± 0.0049	0.9288
Полипloidные клетки	0.0000 ± 0.0000	0.0277 ± 0.0127	0.5533

Примечание. *M* — среднее арифметическое, *SE* — ошибка среднего арифметического, *n* — число обследованных работников ОИИИ, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, рассчитанные по критерию Манна–Уитни.

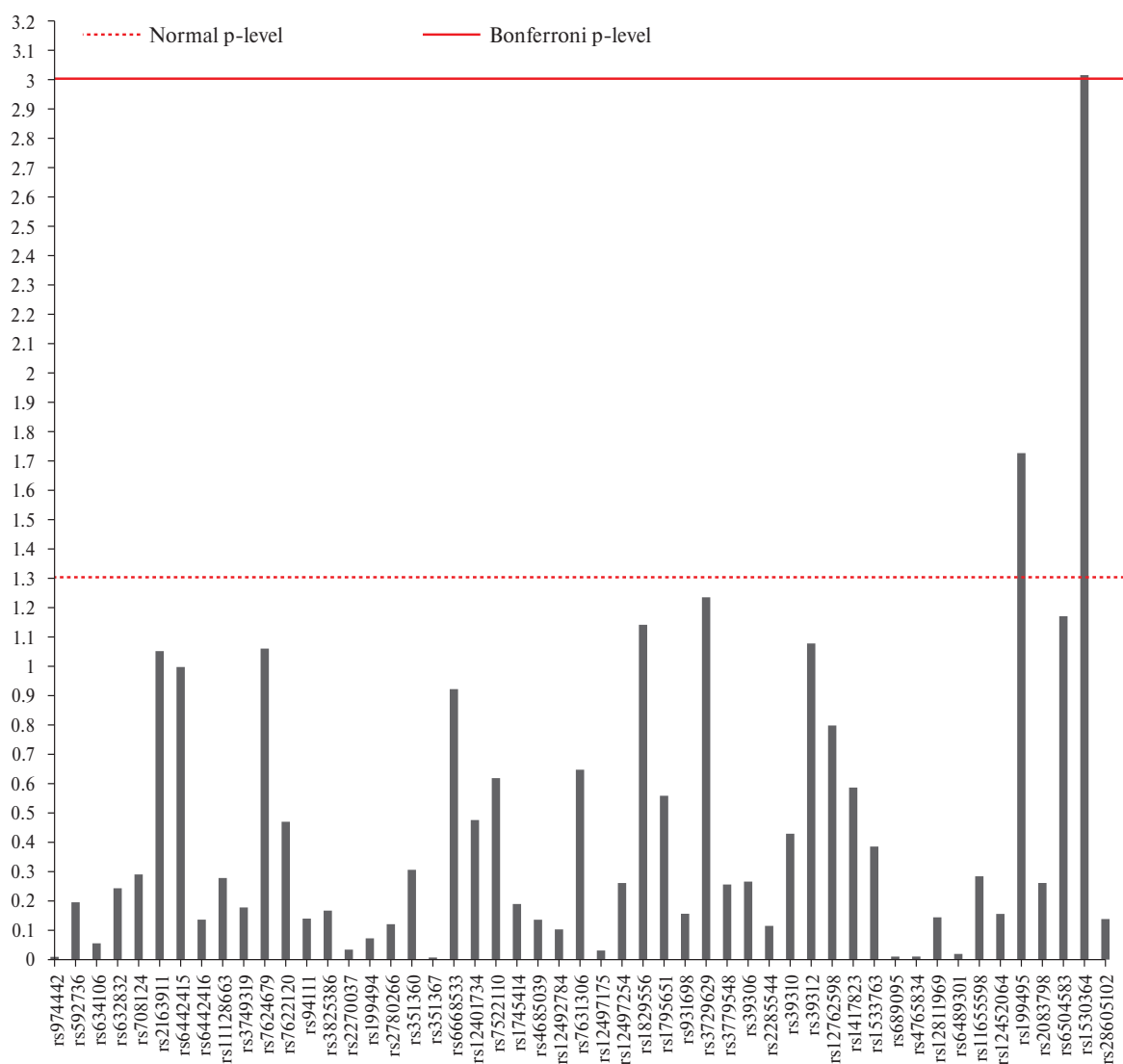
условиях, т. е. выборки стратифицированы, а группа контроля и группа исследования, на которой была изучена ассоциация высокой частоты ЦН с ОНП, не различаются существенным образом, за исключением маркеров радиационного воздействия — кольцевых и дицентрических хромосом. Вероятно, существенный вклад в увеличение частоты ЦН у человека может вносить образ жизни, в частности, курение, употребление алкоголя и др. [16, 19, 20]. Однако частота маркеров радиационного воздействия — кольцевых и дицентрических хромосом, а также частота аберрантных клеток (из-за кольцевых и дицентрических хромосом) статистически значимо выше у работников, подвергавшихся в процессе своей профессиональной деятельности долговременному радиационному воздействию, что потенциально говорит о синергетическом воздействии различных генотоксических

факторов, при этом наблюдается превалирующее действие факторов физической природы, в частности, ИИ, которые и вызывают появление ЦН [21–23].

Далее нами проведена оценка ассоциации частоты радиационно-индуцированных ЦН в зависимости от 51 ОНП изученных генов у работников, входящих в группу исследования. Особое внимание обратили на кольцевые и дицентрические хромосомы.

На рис. 1 представлены уровни значимости для 51 отобранного ОНП (см. выше) по кольцевым хромосомам, на рис. 2 представлены уровни значимости по дицентрическим хромосомам.

На оси ординат отложен отрицательный десятичный логарифм уровня значимости. Линией сверху изображен уровень доверительной вероятности с учетом поправки Бонферрони, равный  $-\log(0.05/51) = 3.0086$ .



**Рис. 1.** Уровни значимости для доминантной модели по частоте кольцевых хромосом.

Примечание. По оси ординат — значение уровня  $p$  в логарифмических координатах  $-\log_{10}$ , пунктирная линия уровень значимости  $p < 0.05$ , рассчитанный по критерию Манна–Уитни, красная линия — уровень поправки Бонферрони.

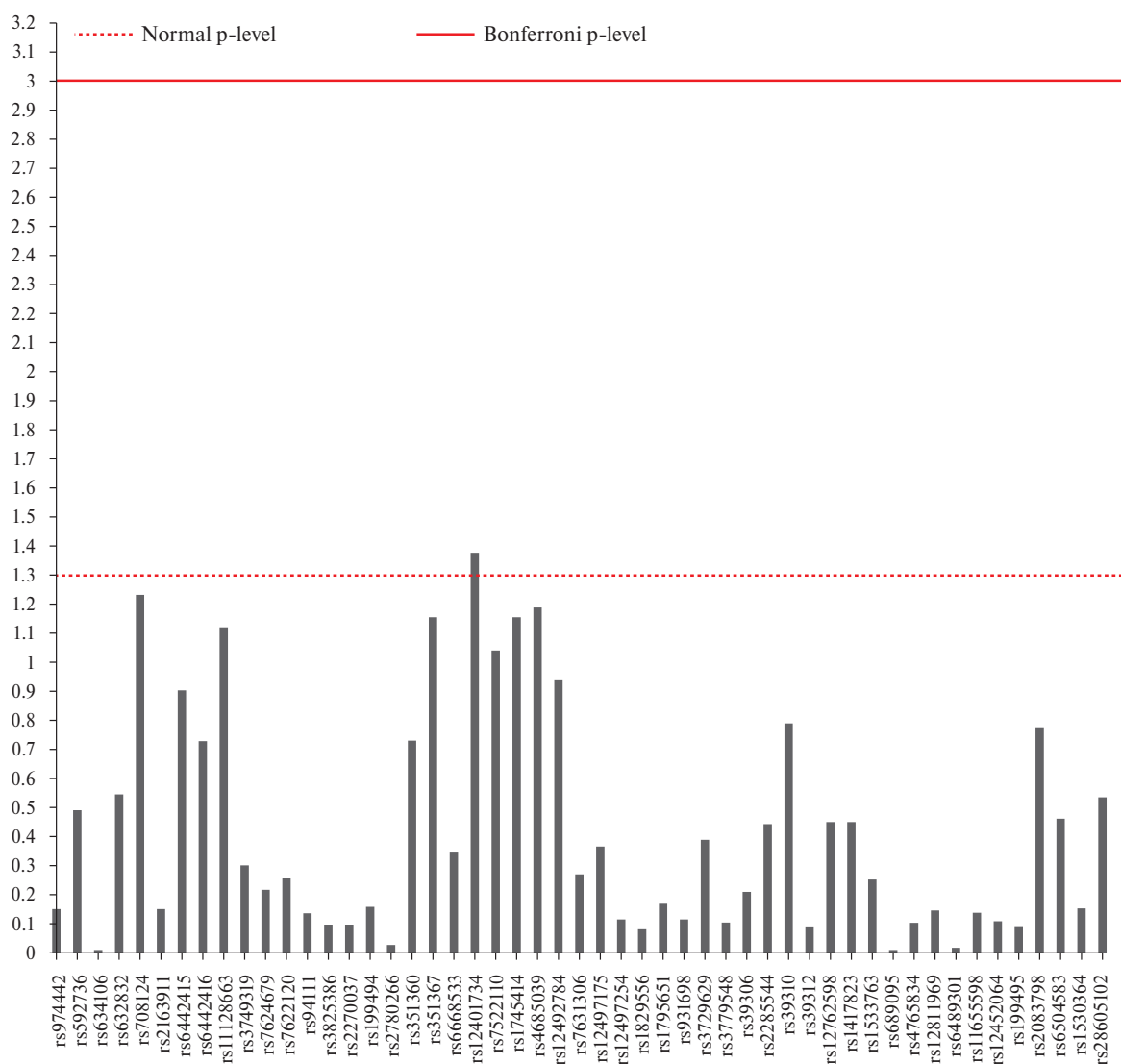
**Fig. 1.** Significance levels for the dominant model by the frequency of ring chromosomes.

Note. The Y-axis shows the value of the p-level in logarithmic coordinates  $-\log_{10}$ , the dotted line is the significance level of  $p < 0.05$  calculated by the Mann–Whitney test, the red line is the Bonferroni correction level.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, с учетом поправки Бонферрони из 51 выявленного ОНП анализ данных генотипирования, проведенный по всем четырем генотипическим моделям, показал ассоциацию только с высокой частотой кольцевых хромосом (маркером радиационного воздействия) по доминантной модели мажорного генотипа для 1 ОНП *WNT9B rs1530364* (табл. 3). Для других типов ЦН не установлено статистически значимых показателей с проанализированными ОНП.

Полиморфный вариант *rs1530364* является интронным, принадлежит гену *WNT9B*, располагается в позиции chr17:46874411 (GRCh38.p14). Для ОНП *WNT9B rs1530364* была показана связь гаплотипа rs1530364-G с несиндромальной расщелиной губы [24–27]. Иная информация о вкладе этого ОНП в регуляцию функциональной активности *WNT9B* отсутствует.



**Рис. 2.** Уровни значимости для доминантной модели по частоте дицентрических хромосом.

Примечание. По оси ординат — значение уровня  $p$  в логарифмических координатах  $-(\log_{10})$ , пунктирная линия — уровень значимости  $p < 0.05$ , рассчитанный по критерию Манна–Уитни, красная линия — уровень поправки Бонферрони.

**Fig. 2.** Significance levels for the dominant model by the frequency of dicentric chromosomes.

Note. The Y-axis shows the value of the  $p$ -level in logarithmic coordinates  $-(\log_{10})$ , the dotted line is the significance level of  $p < 0.05$  calculated by the Mann–Whitney test, the red line is the Bonferroni correction level.

**Таблица 3.** Частота кольцевых хромосом (на 100 клеток,  $M \pm SE$ ) в зависимости от генотипов по изученным ОНП у работников группы исследования

**Table 3.** The frequency of ring chromosomes (per 100 cells,  $M \pm SE$ ) depending on the genotypes for the studied SNP in workers of the research group

ОНП	Частота кольцевых хромосом по генотипам			<i>p</i>
Аддитивная модель				
<i>WNT9B rs1530364</i>	<i>G/G</i> , <i>n</i> = 37	<i>G/A</i> , <i>n</i> = 47	<i>A/A</i> , <i>n</i> = 11	0.0023
	0.3660 ± 0.0594	0.1293 ± 0.0288	0.1212 ± 0.0678	
Рецессивная модель				
<i>WNT9B rs1530364</i>	<i>G/A + G/G</i> , <i>n</i> = 84	<i>A/A</i> , <i>n</i> = 11		0.3060
	0.2335 ± 0.0331	0.1212 ± 0.0678		
Доминантная модель				
<i>WNT9B rs1530364</i>	<i>G/A + A/A</i> , <i>n</i> = 58	<i>G/G</i> , <i>n</i> = 37		<b>0.0009</b>
	0.1277 ± 0.0264	0.3660 ± 0.0594		
Сверхдоминантная модель				
<i>WNT9B rs1530364</i>	<i>G/G + A/A</i> , <i>n</i> = 48	<i>G/A</i> , <i>n</i> = 47		0.0143
	0.3099 ± 0.0503	0.1293 ± 0.0288		

Примечание. *M* — среднее арифметическое, *SE* — ошибка среднего арифметического, *n* — число обследованных с данным генотипом в группе при  $p < 0.05$ , полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия с поправкой Бонферрони  $p = 0.0009$ .

Нами выявлено, что для ОНП *WNT9B rs1530364* носители мажорного генотипа имели частоту кольцевых хромосом в 3 раза выше в сравнении с носителями рецессивного генотипа при дозах облучения ИИ, которые приводят к статистически значимому повышению частоты ЦН, но находятся на плато кривой “доза–частота ЦН”, иначе говоря, в диапазоне 100–500 мГр частота ЦН линейно не растет [28] при относительно одинаковых дозах внешнего облучения ИИ.

*WNT9B* локализован в длинном плече 17-й хромосомы (17q21.32). *WNT9B* кодирует лиганд, который соединяется с рецептором Frizzled и впоследствии активирует канонический путь *WNT/β-catenin* [29]. *WNT9B* является геном-мишенью Hedgehog и контролирует клеточную пролиферацию и клеточную полярность [30]. Важно отметить, что WNT-белки имеют иммунорегуляторные функции, включая регуляцию дифференцировки, фенотипа и функции Т-лимфоцитов [31].

Основываясь на функции *WNT9B*, можно предположить, что нарушения в работе могут способствовать снижению пролиферативной активности

лимфоцитов или ингибированию апоптоза и сохранению ЦН в лимфоцитах крови.

Данные о взаимосвязи ИИ и функционировании *WNT9B* получены нами впервые. При этом есть информация, что WNT-сигнальный путь регулирует радиорезистентность опухолевых клеток [32]. Более того, передача сигналов WNT участвует в радиорезистентности опухолевых стволовых клеток [9]. Wang J.F. et al. указывают, что путь WNT/β-катенина играет важную роль в радиопротекции [11]. Василец Ю.Д. и соавт. показали, что ИИ индуцировало ядерную транслокацию и накопление β-катенина [33]. Wang P. et al. обнаружили, что WNT/β-катенин может играть важную роль в стимулировании аномальной пролиферации и миграции эпителиальных клеток хрусталика после облучения низкими дозами ИИ [34].

Помимо этого, имеются данные о связи WNT-сигнального пути, а в ряде работ и *WNT9B*, с различного рода заболеваниями [35, 36], в том числе и злокачественными новообразованиями [37–39].

Эти факты заметно усложняют любое определение точной функции пути WNT. Однако неоспоримо, что путь WNT/β-катенина играет важную роль в предотвращении повреждений, вызванных ИИ.

И aberrantная передача сигналов WNT приводит к широкому спектру патологий у людей [11].

Ген *WNT9B* мало изучен, однако имеющиеся данные позволяют предположить его активное участие во многих процессах, связанных с защитным действием от воздействия ИИ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлен ОНП гена *WNT9B rs1530364*, который может рассматриваться в качестве потенциального маркера повышенного уровня ИРЧ. Для работников ОИИИ показано, что мажорный генотип *rs1530364* ассоциирован с повышенной частотой кольцевых хромосом при хроническом профессиональном облучении ИИ в диапазоне доз 100–500 мГр. Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие валидационные исследования на расширенной выборке людей, подвергавшихся долговременному техногенному профессиональному облучению ИИ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rim E.Y., Clevers H., Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Ann. Rev. Biochem.* 2022;91(1):571–598. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320-103615>
- Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* 2012;13(12): 767–779. <http://doi.org/10.1038/nrm3470>
- van Amerongen R., Nusse R. Towards an integrated view of WNT signaling in development. *Development.* 2009;136(19):3205–3214. <http://doi.org/10.1242/dev.033910>
- Nusse R., Clevers H. WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017;169:985–999. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Lacombe J., Zenhausem F. Effect of mechanical forces on cellular response to radiation. *Radiother. Oncol.* 2022;176:187–198. <http://doi.org/10.1016/j.radonc.2022.10.006>
- Dong Z., Zhou L., Han N., et al. WNT/ $\beta$ -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells. *Strahlenther Onkologie.* 2015;191(8):672–680. <http://doi.org/10.1007/s00066-015-0858-7>
- Yang Y., Zhou H., Zhang G., et al. Targeting the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway in cancer radioresistance: Updates on the molecular mechanisms. *J. Cancer Res. Therap.* 2019;15(2):272–277. [http://doi.org/10.4103/jcr.t.JCRT\\_421\\_18](http://doi.org/10.4103/jcr.t.JCRT_421_18)
- Woodward W.A., Chen M.S., Behbod F., et al. WNT/ $\beta$ -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007;104(2):618–623. <http://doi.org/10.1073/pnas.0606599104>
- Chen M.S., Woodward W.A., Behbod F., et al. WNT/ $\beta$ -catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J. Cell Sci.* 2007;120(3):468–477. <http://doi.org/10.1242/jcs.03348>
- Xiao Q., Chen Z., Jin X., et al. The many postures of noncanonical WNT signaling in development and diseases. *Biomed. & Pharmacother.* 2017;93:359–369. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.061>
- Wang J.F., Liu C., Zhang Q., et al. Research progress in the radioprotective effect of the canonical WNT pathway. *Cancer Biol. Med.* 2013;10(2):61. <http://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.02.001>
- Watson R.L., Spalding A.C., Zielske S.P., et al. GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin modulate radiation cytotoxicity in pancreatic cancer. *Neoplasia.* 2010;12(5):357–65. <http://doi.org/10.1593/neo.92112>
- Аклеев А.В. Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2009;49(1):5–20. [Akleev A.V. Reakcii tkanej na hronicheskoe vozdejstvie ioniziruyushchego izlucheniya. *Radiation Biology. Radioecology.* 2009;49(1):5–20. (In Russ.)]
- Алексанин С.С. Закономерности формирования соматической патологии в отдаленном периоде после аварии на Чернобыльской АЭС и опыт оказания адресной медицинской помощи ликвидаторам после аварии. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* 2010;1(3):128–134. [Aleksanin S.S. Zakonomernosti formirovaniya somaticheskoy patologii v otdalennom periode posle avarii na Chernobyl'skoj AES i opyt okazaniya adresnoj medicinskoj pomoshchi likvidatoram posle avarii. *Medical and Biological Problems of Life Activity.* 2010;1(3):128–134. (In Russ.)]
- Barnett G.C., Coles C.E., Elliott R.M., et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):65–77. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70302-3](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70302-3)
- Литвяков Н.В., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. и др. Генетические маркеры индивидуальной радиочувствительности человека. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2011. 186 с. [Litvyakov N.V., Karpov A.B., Tahauov R.M., i dr. Geneticheskie markyory individual'noj radiochuvstvitel'nosti cheloveka. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo universiteta, 2011. 186 p. (In Russ.)]
- Takhauov R.M., Karpov A.B., Albach E.N., et al. The bank of biological samples representing individuals exposed to long-term ionizing radiation at various doses. *Biopreserv. Biobank.* 2015;13(2): 72–78. <http://doi.org/10.1089/bio.2014.0035>
- Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В., и соавт. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014;54(3):283–296. [Litvyakov N.V., Frejdin M.B., Khalyuzova M.V. i soavt. Chastota i spektr citogeneticheskikh narushenij u rabotnikov Sibirskogo himicheskogo kombinata. *Radiation Biology. Radioecology.* 2014;54(3):283–296. (In Russ.)] <http://doi.org/10.7868/S0869803114030084>

19. Моссе И.Б. Лекции по радиационной генетике. Мн.: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2005. 208 с. [Mosse I.B. Lekcii po radiacionnoj genetike. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, 2005. 208 p. (In Russ.)]
20. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Ч. 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа. *Экол. генетика*. 2006;4(4):38–54. [Ingel' F.I. Perspektivy ispol'zovaniya mikroyadernogo testa na limfocitah krovi cheloveka, kul'tiviruemyh v usloviyah citokineticheskogo bloka. Chast' 2. Faktory sredy i individual'nye osobennosti v sisteme nestabil'nosti genoma cheloveka. Dopolnitel'nye vozmozhnosti testa. Metodika provedeniya eksperimentov i citogeneticheskogo analiza. *Ecological Genetics*. 2006;4(4):38–54. (In Russ.)]
21. Петин В.Г. Комбинированное биологическое действие ионизирующих излучений и других вредных факторов окружающей среды (научный обзор). *Радиация и риск (Бюлл. Национального радиационно-эпидемиологического регистра)*. 2001;12:117–134. [Petin V.G. Kombinirovannoe biologicheskoe dejstvie ioniziruyushchih izluchenij i drugih vrednyh faktorov okruzhayushchej sredy (nauchnyj obzor). *Radiation and Risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry)*. 2001;12:117–134 (In Russ.)]
22. Тихонов М.Н. Влияние малых доз ионизирующей радиации на здоровье человека. *Экология пром. производств*. 2011;2:27–39. [Tihonov M.N. Vliyanie malyh doz ioniziruyushchej radiacii na zdorov'e cheloveka. *Ekologiya promyshlennogo proizvodstva*. 2011;2:27–39. (In Russ.)]
23. Аржавкина Л.Г., Харченко Т.В. Соматические мутации в некоторых профессиональных когортах. *Изв. Рос. воен.-мед. академии*. 2020;39(S3-1):9–13. [Arzhavkina L.G., Kharchenko T.V. The somatic mutations impact in some professional cohorts. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2020;39(S3-1):9–13. (In Russ.)]
24. Jain R., Dharma R.M., Dinesh M.R., et al. Association of WNT9B rs1530364 and WNT5A rs566926 Gene Polymorphisms with Nonsyndromic Cleft lip and Palate in South Indian Population using Deoxyribonucleic Acid Sequencing. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2020;11(1):60–66. [http://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_90\\_19](http://doi.org/10.4103/ccd.ccd_90_19)
25. Maili L., Letra A., Silva R., et al. PBX-WNT-P63-IRF6 pathway in nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and molecular teratology*. 2020;112(3):234–244. <http://doi.org/10.1002/bdr2.1630>
26. Fontoura C., Silva R.M., Granjeiro J.M., et al. Association of WNT9B Gene Polymorphisms With Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Brazilian Nuclear Families. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2015;52(1):44–48. <http://doi.org/10.1597/13-146>
27. Letra A., Maili L., Mulliken J.B., et al. Further evidence suggesting a role for variation in ARHGAP29 variants in nonsyndromic cleft lip/palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and molecular teratology*. 2014;100(9):679–685. <http://doi.org/10.1002/bdra.23286>
28. Исубакова Д.С., Халюзова М.В., Литвяков Н.В. и соавт. Цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови у работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся профессиональному облучению. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021;61(4):353–366. [Isubakova D.S., Khalyuzova M.V., Litviakov N.V. i soavt. Citogeneticheskie narusheniya v limfocitah krovi u rabotnikov Sibirskogo himicheskogo kombinata, podvergavshihся professional'nomu oblucheniyu. *Radiation Biology. Radioecology*. 2021;61(4):353–366. (In Russ.)] <http://doi.org/10.31857/S0869803121040056>
29. Clevers H. WNT/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469–480. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
30. Regard J.B., Malhotra D., Gvozdenovic-Jeremic J., et al. Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat. Med*. 2013;19(11):1505–1512. <http://doi.org/10.1038/nm.3314>
31. Wallace J., Narasipura S.D., Sha B.E., et al. Canonical WNTs Mediate CD8<sup>+</sup> T Cell Noncytolytic Anti-HIV-1 Activity and Correlate with HIV-1 Clinical Status. *J. Immunol*. 2020;205(8):2046–2055. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1801379>
32. Zhao Y., Tao L., Yi J., et al. The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance. *Cell. Physiol. Biochem*. 2018;48(2):419–432. <http://doi.org/10.1159/000491774>
33. Василец Ю.Д., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А., Шевченко В.Е. Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы. *Успехи молек. онкологии*. 2018;5(4):94–103. [Vasilets Yu.D., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A., Shevchenko V.E. WNT-signaling pathway in pathogenesis of glioblastoma multiforme. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(4):94–103. (In Russ.)] <http://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-4-94-103>
34. Wang P., Li Y.W., Lu X., et al. Low-dose ionizing radiation: Effects on the proliferation and migration of lens epithelial cells via activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2023;888:503637. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503637>
35. Lemire G., Zheng B., Ediae G.U., et al. Homozygous WNT9B variants in two families with bilateral renal agenesis/hypoplasia/dysplasia. *Am. J. Med. Genet*. 2021;185(10):3005–3011. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.62398>
36. Vandenberg M., Andlauer T.F.M., Zhou Y., et al. Genetic Variation in WNT9B Increases Relapse Hazard in Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol*. 2021;89(5):884–894. <http://doi.org/10.1002/ana.26061>
37. Bergholz J., Xiao Z.X. Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression. *Cancer Microenvironment*. 2012;5(3):311–322. <http://doi.org/10.1007/s12307-012-0116-9>



38. MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell.* 2009;17(1):9-26.  
http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016
39. Lu S., Yakirevich E., Yang D., et al. WNT Family Member 9b (WNT9b) Is a New Sensitive and Specific Marker for Breast Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 2021;45(12):1633–1640.  
http://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001784

## Association of *WNT* Gene Polymorphism with Frequency of Cytogenetic Disorders under the Action of Ionizing Radiation

D. S. Isubakova<sup>1,\*</sup>, N. V. Litviakov<sup>1,2</sup>, O. S. Tsymbal<sup>1</sup>, T. V. Vishnevskaya<sup>1</sup>,  
M. Yu. Tsyplenkova<sup>1</sup>, I. V. Milto<sup>1,3</sup>, R. M. Takhauov<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Tomsk National Research Medical Center

of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

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

\*E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, isubakova.daria@yandex.ru

The paper presents the results of a study of the association of single nucleotide polymorphisms of the *WNT* genes with an increased frequency of cytogenetic disorders in the blood lymphocytes of workers at an ionizing radiation facility exposed to long-term radiation exposure at doses of 100–500 mGy. The object of the study was the blood of 95 apparently healthy workers who were subjected to long-term technogenic external exposure to  $\gamma$ -radiation in doses from 100 to 500 mGy in the course of their professional activities. For all examined individuals, a standard cytogenetic analysis of blood lymphocytes was performed. Genomic DNA was isolated from workers' blood lymphocytes using a "QIAamp DNA Blood mini Kit" (Qiagen, Germany). DNA was genotyped for 116 single nucleotide polymorphisms of the *WNT* genes using high-density "CytoScan™ HD Array" (Affymetrix, USA) chips (DNA chips). Taking into account the Bonferroni correction, an association of single nucleotide polymorphisms of the *WNT* genes with a high frequency of circular chromosomes in blood lymphocytes was established, all other types of cytogenetic disorders did not show statistical significance. As a result of the study, a single nucleotide polymorphism of the *WNT9B* gene *rs1530364* was identified, which can be considered as a potential marker of individual radiosensitivity.

**Keywords:** ionizing radiation, chromosomal aberrations, single nucleotide polymorphism, microarray analysis

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Исубакова Дарья Сергеевна (Isubakova Daria Sergeevna),  
isubakova.daria@yandex.ru,  
https://orcid.org/0000-0002-5032-9096

Литвяков Николай Васильевич (Litviakov Nikolay Vasilievich), nvlitv72@yandex.ru,  
https://orcid.org/0000-0002-0714-8927

Цымбал Ольга Сергеевна (Tsymbal Olga Sergeevna),  
olga-tsymbal@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2311-0451

Вишневская Татьяна Валерьевна (Vishnevskaya Tatyana Valerievna), vishnevskaya\_seversk@mail.ru,  
https://orcid.org/0000-0003-2264-0546

Цыпенкова Мария Юрьевна (Tsyplenkova Maria Yurievna), mariatsyplenkova@yandex.ru,  
https://orcid.org/0009-0001-9932-0180

Мильто Иван Васильевич (Milto Ivan Vasilievich),  
milton\_bio@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-9764-4392

Тахауов Равиль Манихович (Takhauov Ravil Manikhovich), niirm2007@yandex.ru,  
https://orcid.org/0000-0002-1994-957X

**Вклад авторов.** Исубакова Д.С. — анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи. Литвяков Н.В. — разработка концепции и дизайна исследования. Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпенкова М.Ю. — сбор и обработка материала, выполнение исследований. Мильто И.В. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование. Тахауов Р.М. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено в рамках государственного задания, тема НИР "Изучение связи однонуклеотидных полиморфизмов генов клеточного цикла с частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови работников Сибирского химического комбината".

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 575.224.23:591.111.1:599.824:621.3.038.628:539.1.047

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ  
ОБЕЗЬЯН *Macaca mulatta* В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ  
УСКОРЕННЫМИ ИОНАМИ КРИПТОНА**

© 2024 г. И. В. Кошлань<sup>1,2\*</sup>, Н. А. Кошлань<sup>1</sup>, М. Д. Исакова<sup>1</sup>,  
Ю. В. Мельникова<sup>1</sup>, А. Г. Беляева<sup>3</sup>, А. А. Перевезенцев<sup>3</sup>, А. С. Штемберг<sup>3</sup>,  
И. Н. Клоц<sup>4</sup>, Т. Е. Гвоздик<sup>4</sup>, А. Н. Бугай<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Государственный университет “Дубна”, Дубна, Россия

<sup>3</sup>Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических  
проблем РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт медицинской приматологии “НИЦ “Курчатовский институт”, Сочи, Россия

\*E-mail: koshlan@jinr.ru

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Проведено исследование цитогенетических нарушений, возникающих в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta*, после локального воздействия ускоренных ионов криптона <sup>78</sup>Kr в дозе 3 Гр на область гиппокампа животных. В ходе анализа в контрольной группе обезьян выявлен низкий уровень хромосомных aberrаций. Количество клеток с хромосомными нарушениями не превышало 1.67 %. Основную долю составляли aberrации хроматидного типа. Проведенный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся воздействию ускоренных ионов криптона, выявил максимальный уровень хромосомных нарушений через сутки после облучения, который превышал контрольный в 2.7 раза. К 96-м суткам количество aberrаций снизилось в 1.7 раза, что по-прежнему превышало контрольный уровень. К 460-м суткам у некоторых животных зафиксировано незначительное повышение количества aberrаций по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В отдаленные сроки у ряда облученных животных наблюдали отклонения от стандартного поведения обезьян. Сопоставлены данные хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян и человека после облучения *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ. Актуальность данной работы обусловлена подготовкой к осуществлению межпланетных пилотируемых космических экспедиций.

**Ключевые слова:** обезьяны, *Macaca mulatta*, ускоренные ионы, лимфоциты, дицентрики, биологическая дозиметрия, космическая радиобиология

DOI: 10.31857/S0869803124020042, EDN: NBLJME

На современном этапе развития космической радиобиологии перед исследователями стоят задачи определения критических параметров, ограничивающих работу космических экипажей за пределами магнитосферы Земли. Появились литературные данные, указывающие на уязвимость центральной нервной системы к воздействию космической радиации и возможному нарушению когнитивных функций у животных [1–2]. В ходе выполнения межпланетных экспедиций возрастает риск облучения экипажа ускоренными тяжелыми заряженными частицами (ТЗЧ) высоких энергий. Вероятность радиационного поражения в этих условиях рассматривается как результат действия ТЗЧ на критические структуры центральной нервной системы, что, в свою очередь, может вызвать изме-

нения высших интегративных функций мозга и привести к нарушениям операторской деятельности экипажей. Это обусловило формирование новой концепции радиационного риска для пилотируемых полетов в дальнем космосе [3].

Спектр галактических космических лучей (ГКЛ) состоит из высокоэнергетических протонов и ТЗЧ с энергиями вплоть до сверхвысокого порядка 10<sup>20</sup> МэВ. Именно ускоренные ионы обладают высокой биологической эффективностью и, несмотря на низкие флюенсы, вносят определяющий вклад в радиационный риск для космонавтов. Защититься от таких высокоэнергетических излучений в условиях космического корабля чрезвычайно сложно. Воздействие этих излучений в наземных условиях возможно смоделировать, исполь-

зую излучение ускорителей, генерирующих заряженные частицы с энергиями, соответствующими ГКЛ. В связи с планами по подготовке к полетам на Марс и изучением воздействия космической радиации, представляющей собой потенциальную угрозу для здоровья космонавтов, увеличилось число проводимых экспериментов на приматах. Только в США количество проведенных в 2016 г. экспериментов на нечеловекообразных обезьянах выросло на 15 % [4]. В ходе текущего исследования проведен эксперимент по локальному облучению ускоренными ионами криптона головы обезьян *Macaca mulatta* и, соответственно, головного мозга, обеспечивающего и определяющего состояние когнитивных функций приматов. Определенный интерес в данном исследовании представляет анализ хромосомных aberrаций, который является характерным и стабильным показателем воздействия радиации на клетки млекопитающих и может служить ретроспективным маркером в отдаленные сроки после облучения.

Работа выполнена в коллаборации с коллегами из Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт” и Института медико-биологических проблем РАН в рамках изучения поведенческих реакций и когнитивных функций у обезьян *Macaca mulatta* в условиях радиационного воздействия в соответствии с Программой подготовки межпланетных пилотируемых полетов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 12 обезьянах-самцах вида *Macaca mulatta* в возрасте до 3 лет и средним весом 3 кг на момент облучения.

На первом этапе эксперимента животные были разделены на две группы. Группа из 12 обезьян являлась обобщенным контролем, часть из которых (пять особей) в последующем были облучены и составили вторую группу. В экспериментальной группе одна обезьяна (№ 383, ИМБП, Москва) за 3 мес. до облучения головы ионами  $^{78}\text{Kг}$  находилась на протяжении 7 сут в условиях антиортостатической гипокинезии. Четыре обезьяны экспериментальной группы из питомника Института медицинской приматологии (г. Адлер) перед облучением головы животными ионами  $^{78}\text{Kг}$  перенесли транспортировку самолетом Адлер—Москва.

Контрольную группу приматов разбили на несколько подгрупп, поскольку животные находились в разных городах (питомник в Адлере, виварий в Москве). Первую подгруппу (контроль со стрессом) составили четыре обезьяны, которые

перенесли транспортировку самолетом Адлер—Москва, и перед облучением у них был произведен забор венозной крови. Во вторую подгруппу (контроль Адлер) вошли две обезьяны из питомника Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт”, которые не покидали своего места расположения. Третья подгруппа (контроль (ИМБП)) — это шесть обезьян из Института медико-биологических проблем РАН. Вторая и третья подгруппы животных служили в качестве контроля на протяжении всего эксперимента.

Перед началом эксперимента животные прошли соответствующий карантин и обследование на наличие патогенной микрофлоры и гельминтов. Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123, и директивы № 2010/63/ EU, принятой Европейским парламентом 22 сентября 2010 г. Разрешение на проведение работ было получено от Комитета по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт медицинской приматологии” (Протокол № 11 от 01.11.2017 г.), который создан и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации, и одобрено заключением комиссии по биоэтике ГНЦ РФ — ИМБП РАН / (№ 461 от 04.12.2017 г.).

Однократное облучение обезьян *Macaca mulatta* ионами  $^{78}\text{Kг}$  проводили на “Нуклотроне” Лаборатории высоких энергий Объединенного института ядерных исследований (Дубна) [5]. Для облучения животных привозили из питомника обезьян Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт” (Сочи) и Института медико-биологических проблем (Москва). После облучения животных возвращали в исходные условия проживания, которые были аналогичными для обеих групп.

Пучок ядер криптона направлялся в область головы с затылочной части черепа. Основная часть потока облучения приходилась на гиппокамп, т.е. были облучены только локальные участки мозга. Пучок в месте облучения обезьян был узким и имел в сечении форму, близкую к эллипсу. Расчет средней линейной передачи энергии (ЛПЭ) ядер криптона проводился с учетом затылочной кости мозга толщиной 0.5 см и плотностью 1.85 г/см<sup>3</sup> и составил 260 кэВ/мкм. Поток ядер криптона, необходимый для создания в мозге поглощенной дозы 1 Гр, равен  $2.4 \cdot 10^6$  ядер/см<sup>2</sup>. Измерение потока частиц, прошедших через мозг обезьян, осуществлялось

с помощью пролетной ионизационной камеры, предварительно градуированной в этом пучке ядер криптона по показаниям сцинтилляционного счетчика, устанавливаемого на пучок. Чувствительность камеры к ядрам  $^{78}\text{Kг}$  с энергией 2.3 ГэВ/н составила 14.0 ядра на 1 импульс камеры. Фоновый счет камеры составлял менее 1%. В ходе облучения через мозг обезьян прошло от  $7.365 \cdot 10^6$  до  $8.336 \cdot 10^6$  ядер. Длительность облучения обезьян составила 5–8 мин. Локальная доза облучения составила около 3 Гр. Доза усредненная по всему мозгу обезьян, оценивается примерно в 0.15 Гр (расчетная масса мозга обезьян считалась равной 100 г).

Отдельно проведено облучение лимфоцитов крови *in vitro* у трех контрольных обезьян *Macaca mulatta* на пучке фазотрона Медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ протонами с исходной энергией 170 МэВ в дозах 1, 2, 3, 4 и 5 Гр при мощности 0.4 Гр/мин.

Забор венозной крови у животных выполняли в разные сроки после облучения головы обезьян. Через 1, 40, 96 и 460 сут после облучения забор крови из вены осуществляли у всех облученных животных, а на 7-е и 350-е сутки — только у обезьяны № 383, которая обитала в виварии ИМБП. Во время взятия крови обезьяны находились под наркозом. Анестезия использовалась на всех сроках забора крови у обезьян. Транквилизацию обезьян проводили с помощью комбинации препаратов “Ксила” (Interchemie, Голландия), 0,1 мл/кг веса животного, и “Золетил” (Virbac, Франция), 0,05 мл/кг веса животного. Венозную кровь животных отбирали в специальные одноразовые стерильные вакуумные пробирки с гепарином (BD Vacutainer® Plus). Образцы крови доставляли в Лабораторию радиационной биологии (г. Дубна), где осуществлялись все процедуры по культивированию, приготовлению цитогенетических препаратов и анализу хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta*. Лимфоциты культивировали в соответствии со стандартным протоколом [6] с некоторой модификацией методики. Использовали полную питательную среду RPMI-1640 с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 2% антибиотика. Для стимуляции клеток к вступлению в митоз добавляли в полную питательную среду 4% фитогемагглютина (РНА, Sigma-Aldrich) и 0.05% форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА, Sigma-Aldrich). Инкубацию клеточной культуры осуществляли в атмосфере с содержанием 5%  $\text{CO}_2$ .

Для накопления клеток на стадии метафазы использовали ингибитор образования веретена деления колцемид, который добавляли за 2 ч до фиксации в конечной концентрации 0.12 мкг/мл. После осаждения лимфоцитов центрифугированием проводили гипотоническую обработку 0.075 моль/л раствором КС1. Клетки фиксировали свежеприготовленной и охлажденной до  $-20^\circ\text{C}$  смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Классификацию хромосомных нарушений проводили по общепринятой методике, рекомендованной МАГАТЭ [7].

Препараты лимфоцитов готовили раскапыванием клеточной суспензии на влажные стекла с последующим их окрашиванием свежеприготовленным 3%-ным раствором Гимза на фосфатном буфере. Для анализа лимфоцитов общепринятым метафазным методом использовали стандартные световые микроскопы (Olympus CX41). В анализ включали все встреченные полные метафазы с числом хромосом  $42 \pm 1$  и хорошим разбросом хромосом. Неполные метафазы и метафазы с множественными наложениями из анализа исключались. Учитывали все виды хромосомных aberrаций, выявляемых без проведения кариотипирования. При анализе хромосомных нарушений к дицентрику и центральному кольцу относили по одному сопутствующему фрагменту.

У животных проанализированы цитогенетические показатели через 1, 7, 40, 96 и 460 сут после облучения головы обезьяны ионами  $^{78}\text{Kг}$ . Для каждого образца просчитывали от 500 до 1000 клеток. Общее количество клеток, просчитанных для контрольных обезьян, составило более 11000 клеток, а для облученных — более 19000. Отдельно было просчитано более 4000 клеток крови, облученной *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ.

Гематологический анализ крови обезьян проводили на анализаторе фирмы Beckman 5 diff, USA.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel. Данные на графиках и таблицах представлены как среднее арифметическое результатов, полученных для каждого животного в группе по всем исследуемым параметрам. Частоту хромосомных нарушений рассчитывали на 100 клеток. Статистическая неопределенность измеренного числа хромосомных aberrаций была рассчитана с учетом количества проанализированных метафаз как  $\sqrt{(n/N)}$ , где  $n$  — общее количество выявленных aberrаций, а  $N$  — общее количество проанализированных клеток. Результаты гематологических

**Таблица 1.** Хромосомные нарушения в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta*  
**Table 1.** Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys

Показатель	Число обезьян	Просчитано клеток	Клетки с аберрациями, %	Число аберраций, на 100 клеток	Аберрации, на 100 клеток	
					хроматидные	хромосомные
Контроль со стрессом (транспортировка Адлер–Москва)	4	4000	1.48 ± 0.12	1.48 ± 0.12	0.95 ± 0.10	0.53 ± 0.07
Контроль (Адлер)	2	2400	1.92 ± 0.14	2.08 ± 0.14	1.46 ± 0.12	0.63 ± 0.08
Контроль (ИМБП)	6	4730	1.72 ± 0.13	1.77 ± 0.13	1.27 ± 0.11	0.50 ± 0.07
Обобщенный контроль	12	11130	1.67 ± 0.13	1.73 ± 0.13	1.20 ± 0.11	0.53 ± 0.07

и физиологических показателей представлены как средние значения экспериментов ± стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ хромосомных аберраций у контрольных животных разных подгрупп не выявил существенных отличий по их уровню и спектру. Это позволило обобщить данные по спонтанному уровню хромосомных нарушений, которые в дальнейшем использовали для сравнения выхода хромосомных аберраций у облученных обезьян (табл. 1).

Данные цитогенетического анализа хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* контрольной группы выявили низкий уровень хромосомных аберраций. Среднее количество клеток с хромосомными нарушениями для всего исследованного контроля не превышало 1.67%. В аберрантных клетках, как правило, регистрировалось не более одной аберрации. Сопоставимые данные по анализу спонтанного уровня хромосомных аберраций в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* были получены в работе [8]. Основную долю встреченных хромосомных нарушений (до 72%) составляли аберрации хроматидного типа. Среди них преобладающими оказывались фрагменты.

Количество клеток с дицентриками и центрическими кольцами, встреченных при анализе контрольных образцов, не превышало 0.02 на 100 клеток. Уровень спонтанно возникающих дицентриков в лимфоцитах крови человека, являющийся нормой по рекомендации МАГАТЭ [7], составляет 1 на 1000 клеток. Наблюдаемые в лимфоцитах крови контрольных обезьян *Macaca mulatta* показатели низкого уровня как общего количества возникающих хромосомных аберраций, так и дицентриков, являющихся маркерами радиационного воздействия,

коррелируют с аналогичными показателями, характерными для лимфоцитов крови человека, не подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения. При цитогенетическом анализе также проводилась оценка модального числа хромосом в клетках. По литературным данным кариотип обезьяны *Macaca mulatta* представлен 42 хромосомами [9]. У всех просчитанных образцов модальным числом хромосом являлось 42. При этом как у контрольных, так и у облученных обезьян были встречены полиплоидные клетки. В среднем их уровень не превышал 1–3%.

Проведенный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся воздействию ускоренных ионов  $^{78}\text{Kr}$  в дозе около 3 Гр, позволил выяснить, что средний уровень аберрантных клеток у локально облученных обезьян через сутки после облучения вырос почти в 2.7 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Спустя 7 сут после облучения головы обезьян ионами криптона количество клеток и общее число хромосомных нарушений снизилось на 10–15% и составило 3.9 и 4.6 соответственно, превышая контрольный уровень в 2.3 и 2.6 раза.



**Рис. 1.** Данные цитогенетического анализа лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся локальному воздействию ускоренных ионов  $^{78}\text{Kr}$  в дозе 3 Гр в разные сроки наблюдений.

**Fig. 1.** Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of monkeys locally exposed to 3 Gy of accelerated  $^{78}\text{Kr}$  ions at different observation times.

Основную долю aberrаций представляли хроматидные и хромосомные фрагменты до 80%. На 7-е и 350-е сутки исследования данные представлены только по одной обезьяне, к сожалению, не было возможности провести исследование у остальных облученных животных. Индивидуальные показания обезьян на каждом сроке исследования представлены в табл. 2.

При исследовании хромосомных нарушений в первые сроки после облучения (1-е и 7-е сутки) практически у каждой обезьяны были встречены клетки с многочисленными aberrациями в одной клетке (от 2 до 5). В дальнейшем вплоть до 96-х суток происходит снижение клеток с хромосомными aberrациями и уменьшение количества клеток с множественными aberrациями. В отдаленные сроки исследования встречаются только единичные клетки с двумя aberrациями. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными по снижению уровня хромосомных нарушений у человека, проанализированными после инцидента с тотальным воздействием  $\gamma$ -излучений в разных дозах [10].

К 460-м суткам исследования средний уровень хромосомных нарушений сохранялся повышенным, превышая показатели необлученного контроля в 1.8 раза. При этом отмечается незначительное повышение среднего уровня хромосомных нарушений по сравнению с предыдущим сроком исследования. Значительный вклад в это повышение вносили две обезьяны (42118 и 42031), у которых на протяжении всего эксперимента наблюдался более высокий уровень клеток с хромосомными нарушениями по сравнению с остальными облученными обезьянами (табл. 2). Стоит отметить, что у остальных обезьян в отдаленные сроки после облучения отсутствовали клетки с множественными aberrациями, тогда как у двух обезьян (42118 и 42031) на каждом сроке исследования до 5% клеток от общего числа aberrантных клеток были клетками с двумя и более aberrациями, и данное соотношение сохранялось на протяжении всего исследуемого срока. Сохранение повышенного уровня структурных повреждений хромосом наблюдали в более ранних работах на обезьянах *Macaca mulatta*. Было показано сохранение в костном мозгу животных, переживших общее разовое и длительное  $\gamma$ -облучение в дозе 410-650 Р, повышенного уровня спустя 9–13 лет [11, 12]. А повышенный уровень хромосомных транслокаций в лимфоцитах крови облученных обезьян сохранялся через 28 лет после облучения [13].

Результаты анализа дицентриков и центрических колец показали, что через 1 сут после локального облучения ионами криптона средний уровень дицентриков и центрических колец вырос в более чем 11 раз по сравнению с контролем и оставался повышенным на протяжении всех сроков исследования. К 460-м суткам исследования маркеры радиационного воздействия все еще превышали показатели контрольного уровня. Уровень хроматидных и хромосомных фрагментов к этому сроку также снизился. Вместе с тем на 460-е сутки отмечено увеличение числа хромосомных фрагментов по сравнению с предыдущим сроком наблюдений с 0.30 до 0.75 на 100 клеток.

Проведенное исследование позволило оценить динамику снижения клеток с хромосомными aberrациями. В течение первых трех месяцев после локального облучения головы обезьян уровень хромосомных aberrаций снизился на 40%. Примечательно, что даже после локального облучения головы обезьян уровень дицентриков и центрических колец сохраняется повышенным на протяжении всего периода наблюдения без какой-либо тенденции к их снижению. Аналогичные результаты по сохранению хромосомных нарушений наблюдались в лимфоцитах детей и подростков, проживавших на радиоактивно загрязненных областях в течение 17 лет после Чернобыльской аварии [14].

Снижение общего числа хромосомных aberrаций, по всей видимости, связано с элиминацией из циркулирующей крови клеток с нестабильными хромосомными aberrациями. Сохранение в лимфоцитах крови повышенного по сравнению с контролем уровня дицентриков и иных типов хромосомных aberrаций через 460 суток после облучения головы обезьян *Macaca mulatta*, скорее всего, указывает на существование фракции лимфоцитов с разной продолжительностью жизни, которая может варьировать от 15 дней до 6 лет [15].

Метод биологической дозиметрии, основанный на оценке хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови, зарекомендовал себя надежным показателем, поскольку количество aberrаций, вызванных ионизирующим излучением, соответствует поглощенной дозе. Исследование дозовой зависимости выхода хромосомных aberrаций, регистрируемых в лимфоцитах периферической крови обезьян, является важной задачей с целью определения поглощенной дозы в дальнейших планируемых модельных экспериментах на обезьянах *Macaca mulatta* при подготовке к полетам за пределами магнитосферы Земли и сопоставлении

полученных данных с имеющимися таковыми для человека.

Ранее в нашей лаборатории получены результаты цитогенетического исследования клеток человека после облучения протонами разных энергий [16–18]. Данные после воздействия протонов с энергией 170 МэВ и 1 ГэВ на лимфоциты человека и обезьян при облучении крови *in vitro* представлены на рис. 2. Характер дозовой зависимости по выходу клеток с хромосомными aberrациями после воздействия

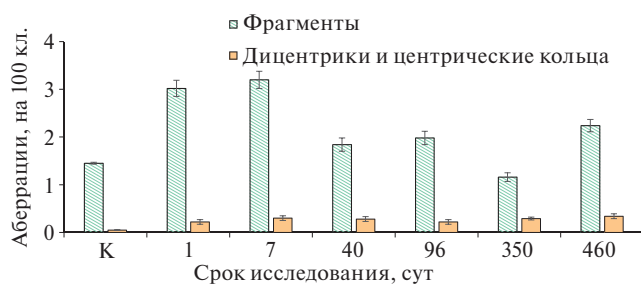
протонов на лимфоциты обезьян имеет линейный вид вплоть до 4 Гр с последующим отклонением от линейности и выходом на уровень насыщения. Для общего числа хромосомных aberrаций наблюдается степенная линейно-квадратичная зависимость от дозы вследствие вклада aberrаций двухударного типа.

Основной тип хромосомных aberrаций, выявленных в лимфоцитах крови обезьян после облучения протонами с энергией 170 МэВ при анализе стандартным метафазным методом, составили

**Таблица 2.** Хромосомные нарушения в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* на разные сроки после облучения головы обезьян ионами криптона

**Table 2.** Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys at different times after irradiation of the monkeys' heads with krypton ions

№ исследуемых обезьян	Срок исследования, сутки	Просчитано клеток	Клетки с aberrациями, %	Количество aberrаций, на 100 кл.	Дисцентрики и кольца, на 100 кл.	Фрагменты, на 100 кл.
42118	1	1000	5.20	5.80	0.40	2.50
42031		1000	6.00	7.30	0.50	5.00
41930		1000	3.70	3.90	0	2.80
42090		1000	3.70	4.40	0.20	2.60
383		1000	4.00	4.00	0	2.20
<b>Среднее за 1 сут</b>		<b>5000</b>	<b>4.52 ± 0.21</b>	<b>5.08 ± 0.22</b>	<b>0.22 ± 0.05</b>	<b>3.02 ± 0.17</b>
383	7	1000	3.90 ± 0.20	4.60 ± 0.21	0.30 ± 0.05	3.20 ± 0.18
42118	40	1000	3.80	3.90	0.40	2.20
42031		1000	3.50	3.70	0.40	2.50
41930		1000	2.20	2.20	0.30	1.20
42090		1000	2.40	2.50	0.20	1.60
383		1000	2.90	3.10	0.10	1.70
<b>Среднее за 40 сут</b>		<b>5000</b>	<b>2.96 ± 0.17</b>	<b>3.08 ± 0.17</b>	<b>0.28 ± 0.05</b>	<b>1.84 ± 0.14</b>
42118	96	1000	2.70	2.90	0.20	1.90
42031		1000	3.50	3.80	0.40	2.50
41930		1000	2.50	2.70	0.10	1.70
42090		1000	2.70	2.80	0.40	2.00
383		1000	2.10	2.30	0	1.80
<b>Среднее за 96 сут</b>		<b>5000</b>	<b>2.70 ± 0.16</b>	<b>2.90 ± 0.17</b>	<b>0.22 ± 0.05</b>	<b>1.98 ± 0.14</b>
383	350	690	2.61 ± 0.16	2.61 ± 0.16	0.14 ± 0.03	1.16 ± 0.09
42118	460	1000	4.87	5.23	0.36	3.97
42031		883	2.94	3.17	0.45	1.81
41930		1000	2.50	2.60	0.20	1.70
42090		1000	2.20	2.30	0.30	1.80
383		1000	2.60	2.80	0.40	1.90
<b>Среднее за 460 сут</b>		<b>4437</b>	<b>3.00 ± 0.18</b>	<b>3.20 ± 0.17</b>	<b>0.32 ± 0.05</b>	<b>2.24 ± 0.13</b>



**Рис. 2.** Распределение дицентриков, центрических колец и фрагментов в разные сроки наблюдения.

**Fig. 2.** Distribution of dicentrics (Dic), centric rings (Rc), and fragments at different observation times.

дицентрики (до 35–40% от общего числа аберраций). Данные цитогенетического анализа хромосомных нарушений после облучения лимфоцитов крови *in vitro* свидетельствуют о широком спектре возникающих хромосомных аберраций, увеличении их выхода с увеличением дозы лучевого воздействия и отсутствии существенных количественных различий этих показателей у исследуемых обезьян.

Несомненно, полученные результаты представляют большой интерес. Как видно (рис. 3), кривые по частоте образования клеток с хромосомными аберрациями и общему числу аберраций хромосом практически идентичны, что подтверждает одинаковую радиочувствительность клеток человека и обезьян. В литературе имеются фрагментарные сведения о схожей радиочувствительности обезьян и человека после действия рентгеновского или  $\gamma$ -излучения [19].

В ходе проведенного исследования были также проанализированы гематологические, биохимические, молекулярные и поведенческие реакции облученных животных. В результате локального облучения головы по ряду вышеперечисленных показателей были обнаружены изменения некоторых параметров. Данные этого исследования опубликованы в работе [20]. Следует отметить, что все показатели находились в пределах референсных значений для данного вида животных. К 163-м суткам зафиксировано возвращение до контрольных значений по основным гематологическим показателям (например, эритроцитам). Вместе с тем уровень лимфоцитов оставался повышенным на всех сроках наблюдения (рис. 4) и у двух обезьян превышал референсные значения. Возможно, незначительные колебания гематологических показателей связаны с реакцией на облучение мозга и,

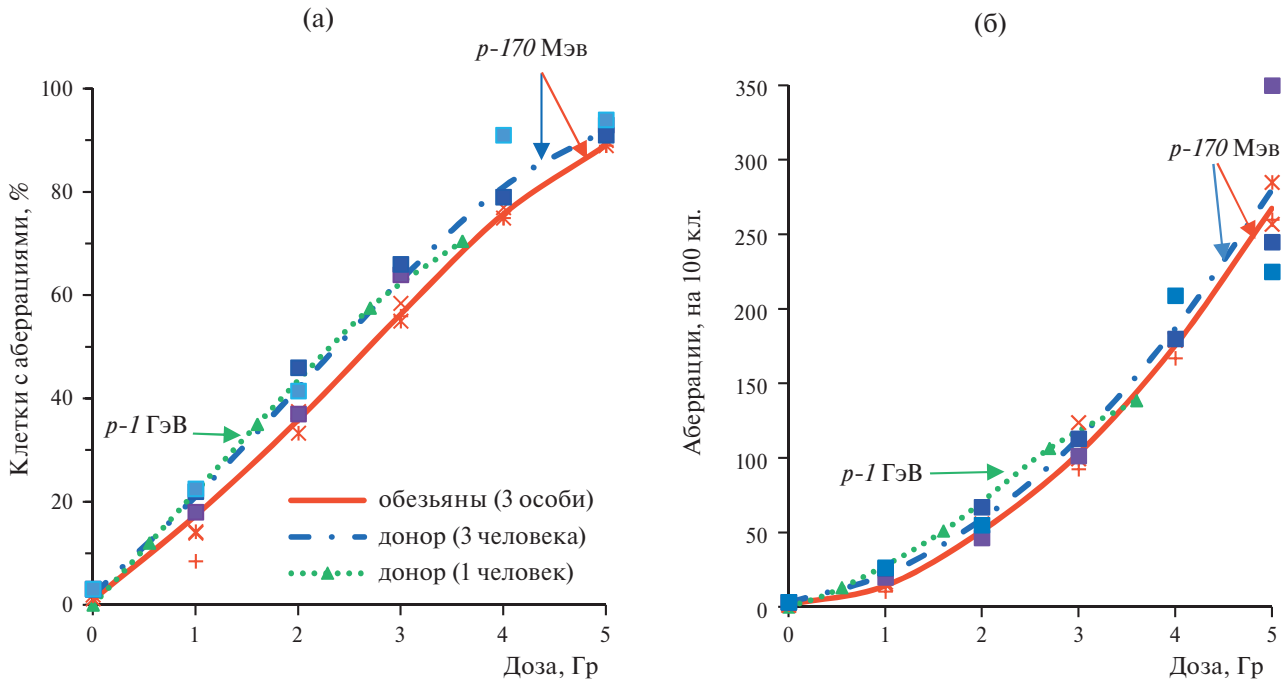
как следствие, возникновением местной воспалительной реакции тканей.

На протяжении всего эксперимента вес как контрольных, так и облученных обезьян постепенно увеличивался. У животных выявлена тенденция к более быстрому набору массы у облученных обезьян, что, возможно, может свидетельствовать о нарушении метаболизма (рис. 5).

По поведенческим реакциям у некоторых облученных животных сформировались устойчивые отклонения от стандартного поведения обезьян. Наиболее выраженные патологии зафиксированы у двух самцов, которые проявлялись в виде эпизодических запрокидываний головы вверх и нехарактерных маятниковых движений тела [21]. Данные отклонения проявились в более поздние сроки наблюдения (460-е сутки) и сохранялись вплоть до 5 лет после облучения. Примечательно, что ряд авторов также отмечают влияние облучения на поведенческие реакции у грызунов и нарушения гиппокамповозависимых форм поведения и обеспечивающих их нейрохимических и молекулярных механизмов [22–24]. В проведенном исследовании обращает на себя внимание возможная корреляция между поведенческими дисфункциями и повышенным уровнем хромосомных аберраций (в том числе дицентриков и центрических колец), который был обнаружен после локального облучения у одной обезьяны (42031) на протяжении всего эксперимента.

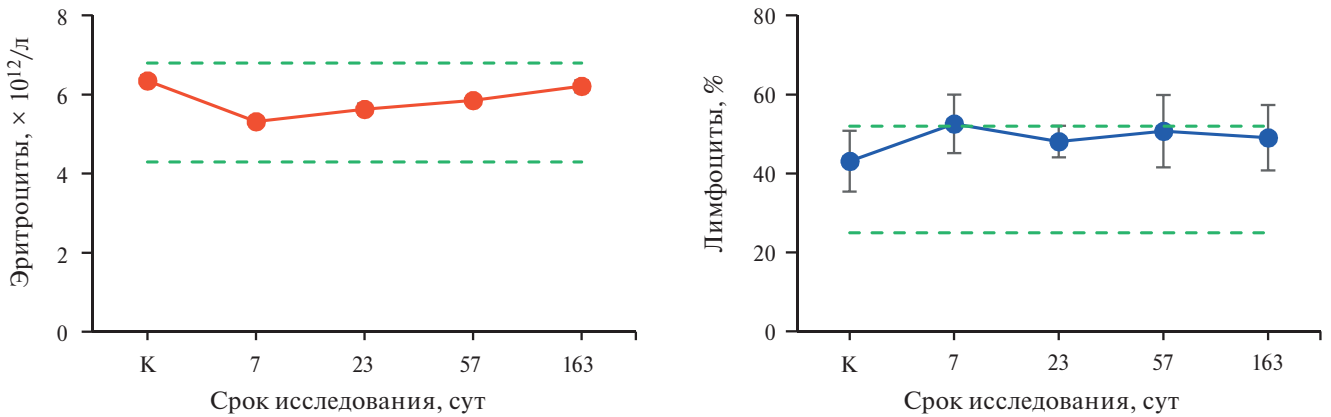
Результаты цитологического анализа после локального облучения головы обезьян ускоренными ионами криптона указывают на то, что поврежденные лимфоциты элиминируются частично, и продолжают циркулировать в кровеносном русле в течение длительного времени после облучения. Возможно, часть из них депонируются в лимфосистеме и выходят в кровеносное русло в поздние сроки наблюдения [25]. Примечательно, что в большинстве работ, посвященных ретроспективной оценке полученных доз в результате различных инцидентов, указывается на экспоненциальное снижение уровня хромосомных аберраций (дицентриков) со временем [26]. Вместе с тем полученные данные демонстрируют эффекты, отличные от стандартных типов облучений, и в ходе даже локального облучения ускоренными ионами могут формироваться более стойкие повреждения в организме животных, которые проявляются в повышении уровня хромосомных аберраций и в отклонении поведенческих реакций в отдаленные сроки наблюдения.





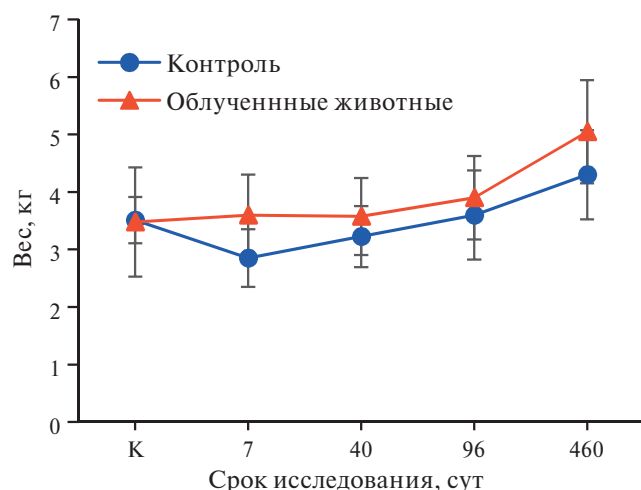
**Рис. 3.** Дозовая зависимость частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями (а) и общего числа хромосомных aberrаций (б) после облучения образцов цельной крови обезьян *Macaca mulatta* и человека протонами 170 МэВ (кривые красного и синего цвета) и 1 ГэВ (кривая зеленого цвета). Прерывистыми линиями представлены усредненные данные по лимфоцитам крови человека, сплошной линией представлены усредненные данные по лимфоцитам крови обезьян. Незакрашенные символы (квадратики и кружки) — данные для каждого отдельного донора (человека), покрашенные символы (треугольники) — данные для каждой особи обезьян.

**Fig. 3.** Dose dependence of the formation frequency of lymphocytes with chromosomal aberrations (a) and the total number of chromosomal aberrations (b) after irradiation of whole blood samples of *Macaca mulatta* monkeys and humans with 170 MeV (the red and blue curves) and 1 GeV (the green curve) protons. The dashed and solid lines represent the average data for human and monkey blood lymphocytes, respectively. The unfilled symbols (squares and circles) represent the data for each individual human donor; the filled symbols (triangles), for each individual monkey.



**Рис. 4.** Уровень эритроцитов и лимфоцитов в разные сроки наблюдений после локального облучения головы обезьян *Macaca mulatta*. Прерывистыми линиями обозначены референсные значения.

**Fig. 4.** Levels of red blood cells and lymphocytes at different observation times after local irradiation of the head of *Macaca mulatta* monkeys. The dashed lines indicate the reference values.



**Рис. 5.** Динамика массы тела облученных и контрольных животных.

**Fig. 5.** Dynamics of the body weight of irradiated and control animals.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* после локального воздействия ускоренных ионов криптона  $^{78}\text{Kr}$  в дозе 3 Гр на область гиппокампа животных выявило сохраняющуюся хромосомную нестабильность в лимфоцитах периферической крови обезьян *Macaca mulatta* на протяжении 460 суток после облучения. Наибольший выход хромосомных aberrаций отмечен через сутки после облучения с последующим их снижением на протяжении всего исследуемого срока. В отдаленные сроки у ряда облученных животных отмечались отклонения от стандартного поведения обезьян. У одного животного отмечается корреляция поведенческой дисфункции и повышенного уровня хромосомных aberrаций.

На основе данных, полученных после облучения *in vitro* лимфоцитов крови обезьян *Macaca mulatta* протонами с энергией 170 МэВ в дозах 1–5 Гр, построены кривые зависимости доза–эффект по выходу хромосомных повреждений. Сопоставление данных хромосомных нарушений, обнаруженных в лимфоцитах крови обезьян и человека после облучения лимфоцитов крови *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ в исследованных дозах не выявило существенных отличий, что указывает на одинаковую радиочувствительность исследуемых объектов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам ГНЦ РФ ИМБП РАН и Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт”, осуществлявшим клиническое, научное и организационное обеспечение эксперимента на приматах, специалистам Медико-технического комплекса для протонной лучевой терапии Г.В. Мицыну, А.Г. Молоканову, С.В. Швидкому, обеспечившим дозиметрию и облучение обезьян протонами на фазотроне ЛЯП ОИЯИ, и сотрудникам ЛРБ ОИЯИ Г.Н. Тимошенко, В.А. Крылову и Е.Е. Павлику, осуществившим на нуклотроне ЛФВЭ ОИЯИ облучение обезьян ускоренными ионами криптона.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы ЛРБ ОИЯИ 05-7-1077-2009 и базовой темы РАН 65.2, FMFR-2024-0036.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Parihar V.K., Allen B., Tran K.K. et al. What happens to your brain on the way to Mars. *Sci. Advances*. 2015;1(4):e1400256. <http://doi.org/10.1126/sciadv.1400256>
2. Parihar V.K., Allen B.D., Caress C. et al. Cosmic radiation exposure and persistent cognitive dysfunction. *Sci. Rep.* 2016;6:34774. <http://doi.org/10.1038/srep34774>
3. Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К вопросу о радиационном барьере при пилотируемых межпланетных полётах. *Вестн. РАН*. 2017;87(1):65–69. <https://doi.org/10.7868/S0869587317010030> [Grigor'ev A.I., Krasavin E.A., Ostrovsky M.A. The problem of the radiation barrier during piloted interplanetary flights. *Herald of the Russian academy of sciences*. 2017;87(1): 63–66. <https://doi.org/10.1134/S1019331617010014> (In Russ.)]
4. Meigs L., Smirnova L., Rovida C. et al. Animal testing and its alternatives — the most important omics is economics. *ALTEX*. 2018;35(3):275–305. <http://doi.org/10.14573/altex.1807041>
5. Балдин А.А., Брандова В., Бутенко А.В. и др. Методика облучения мозга приматов пучком ядер криптона на нуклотроне ЛФВЭ. *Письма в ЭЧАЯ*. 2019;16(4(223)):302–309. [Baldin A. A., Bradnova V., Butenko A. V. et al. Method for irradiation of the brain of primates by the  $^{78}\text{Kr}$  beam extracted from nuclotron at LNER. *Particles and Nuclei, Letters*. 2019;16(4(223)):302–309. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s1547477119040071>
6. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960;20(3):613–616. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)

7. International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Report №. 405. Vienna, 2001.
8. Косиченко Л.П., Барская В.С., Торва Р.А. Цитогенетическое исследование лимфоцитов костного мозга и периферической крови обезьян при длительном гамма-облучении. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1987;104(7): 85–87. [Kosichenko L.P., Barskaia V.S., Torva R.A. Cytogenetic study of the bone marrow and peripheral blood lymphocytes in monkeys in long-term gamma irradiation. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 1987;104(7):85–87. (In Russ.)]
9. Chiarelli B. Comparative morphometric analysis of primate chromosomes. II. The chromosomes of genera *Macaca*, *Papio*, *Theropithecus* and *Cercocebus*. *Caryologia*. 1962;15(2):401–420. <https://doi.org/10.1080/00087114.1962.10796068>
10. Ramalho A.T., Curado M.P., Natarajan A.T. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat. Res.* 1995;331(1):47–54. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00049-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00049-0)
11. Косиченко Л.П. Отдаленный цитогенетический эффект острого облучения у обезьян. Сообщение I. Длительное сохранение поврежденных хромосом в клетках костного мозга обезьян. *Генетика*. 1972;8(3): 105–113. [Kosichenko L.P. Otdalennyj citogeneticheskij effekt ostrogo oblucheniya u obez'yan. Soobshchenie I. Dlitel'noe sohranenie povrezhdenij hromosom v kletkah kostnogo mozga obez'yan. *Genetika*. 1972;8(3): 105–113. (In Russ.)]
12. Косиченко Л.П. Структурные мутации хромосом в клетках костной мозга обезьян в отдаленные сроки после длительного повторного облучения. *Генетика*. 1973;9(1):134–142. [Kosichenko L.P. Strukturnye mutacii hromosom v kletkah kostnoj mozga obez'yan v otdalennye sroki posle dlitel'nogo povtornogo oblucheniya. *Genetika*. 1973;9(1):134–142. (In Russ.)].
13. Lucas J.N., Hill F.S., Burk C.E. et al. Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996;70(3): 309–18. <https://doi.org/10.1080/095530096145049>
14. Михайлова Г.Ф. Анализ результатов цитогенетических исследований населения, проживающего на радиоактивно-загрязненных территориях после чернобыльской аварии. Автореф. дис. на соискание ученой степени докт. биол. наук. Обнинск, 2007. 32 с. [Mihajlova G.F. Analiz rezul'tatov citogeneticheskikh issledovanij naseleniya, prozhivayushchego na radioaktivno-zagryaznennyh territoriyah posle chernobyl'skoj avarii. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni dokt. biolog. nauk. Obninsk, 2007. 32 p. (In Russ.)]
15. Гаврилов О.К., Чертков И.Л., Козинец Г.И. и др. Нормальное кроветворение и его регуляция. М.: Медицина, 1976. 543 с. [Gavrilov O.K., Chertkov I.L., Kozinec G.I. i dr. Normal'noe krovetvorenje i ego reguljacija. M.: Medicina, 1976. 543 p. (In Russ.)].
16. Репин М.В. Стабильные и нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека, индуцируемые излучениями с разными ЛПЭ. Автореферат дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Обнинск, 2000. 18 с. [Repin M.V. Stabil'nye i nestabil'nye hromosomnye aberracii v limfocitah krovi cheloveka, induciруемые izluchenyami s raznymi LPE. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni kand. biolog. nauk. Obninsk, 2000. 18 p. (In Russ.)].
17. Репин М.В., Говорун Р.Д., Красавин Е.А. Хромосомные нарушения в лимфоцитах человека при действии ускоренных заряженных частиц. *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2002;33(3):746–747. [Repin M. V., Govorun R.D., Krasavin E.A. Chromosomal damages in the human lymphocytes induced by accelerated charged particles. *Physics of Elementary Particles and Atomic Nuclei*. 2002;33(3):746–747. (In Russ.)].
18. Говорун Р. Д., Депенас-Каминьска М., Зайцева Е.М. и др. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований. *Письма в ЭЧАЯ*. 2006;3(1(130)):92–100. [Govorun R.D., Deperas-Kaminska M., Zaitseva E.M. et al. The study of chromosomal damages in human cells on irradiation with the therapeutic proton beam of the Joint Institute for Nuclear Research's phasotron. *Particles and Nuclei, Letters*. 2006;3(1):92–100. (In Russ.)].
19. Колюбаева С.Н. Хромосомные aberrации, микроядра и апоптоз в лимфоцитах при радиационных воздействиях и других патологических состояниях. Автореферат дис. на соискание ученой степени доктора биол. наук. Санкт-Петербург, 2010. 261 с. [Kolyubaeva S.N. Hromosomnye aberracii, mikroyadra i apoptoz v limfocitah pri radiacionnyh vozdeystviyah i drugih patologicheskikh sostojaniyah. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni doktora biolog. nauk. Sankt-Peterburg, 2010. 261 p. (In Russ.)].
20. Штемберг А.С., Клоц И.Н., Беляева А.Г. и др. Гематологические, биохимические и молекулярные эффекты облучения головы обезьян ядрами криптона высоких энергий. *Авиакосм. и экол. медицина*. 2020;54(1):38–45. [Shtemberg A.S., Klots I.N., Belyaeva A.G. et al. Hematological, biochemical and molecular effects of primate's head irradiation with high-energy krypton nuclei. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2020;54(1):38–45. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-1-38-45>
21. Клоц И.Н., Кошлань И.В., Тимошенко Г.Н. и др. Отдаленные последствия облучения обезьян ядрами криптона высоких энергий. В кн.: VIII Съезд по радиационным исследованиям, Москва, 2021. Тез. Докл. Дубна: ОИЯИ, 2021. С. 247. [Klots I.N., Koshlan I.V., Timoshenko G.N. et al. Otdalennye posledstviya oblucheniya obez'yan yadrami kriptona vysokih energij. VIII Congress on radiation research, Moscow, 2021. Abstracts. Dubna: JINR, 2021 P. 247 (In Russ.)].
22. Britten R.A., Jewell J.S, Miller V.D. et al. Impaired Spatial Memory Performance in Adult Wistar Rats Exposed to Low (5–20 cGy) Doses of 1 GeV/n <sup>56</sup>Fe Particles. *Radiat. Res.* 2016;185(3):332–7. <https://doi.org/10.1667/RR14120.1>
23. Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B. Heavy particle irradiation, neurochemistry and behavior: thresholds, dose-response curves and recovery of function. *Adv. Space Res.* 2004;33(8):1330–1333. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2003.09.051>

24. Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B. A Longitudinal study of operant responding in rats irradiated when 2 months old. *Radiat. Res.* 2005;164(4):552–5. <http://dx.doi.org/10.1667/rr3349.1>
25. Толстых Е. И., Дегтева М. О., Возилова А. В. и др. Подходы к цитогенетической оценке дозы при радиационном воздействии на лимфоидную ткань кишечника. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2021;61(4):339–52. [Tolstykha E.I., Degteva M.O., Vozilova A.V. et al. Approaches to the cytogenetic assessment of the dose due to radiation exposure of the gut associated lymphoid tissue. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2021;61(4):339–52. (In Russ.)]. <http://dx.doi.org/10.31857/s0869803121040111>
26. Елисова Т.В. Стабильные и нестабильные aberrации хромосом у человека и других млекопитающих в связи с вопросами биологической дозиметрии. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2008;48(1):14–27. [Elisova T.V. Stable and unstable chromosome aberrations in humans and other mammals in relation to the problems of biological dosimetry. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2008;48(1):14–27. (In Russ.)].

## Cytogenetic Violations in Blood Lymphocytes of *Macaca Mulatta* Monkeys in the Long Term after Irradiation with Accelerated Krypton Ions

I. V. Koshlan<sup>1,2\*</sup>, N. A. Koshlan<sup>1</sup>, M. D. Isakova<sup>1</sup>, Yu. V. Melnikova<sup>1</sup>, A. G. Belyaeva<sup>3</sup>,  
A. A. Perevezentsev<sup>3</sup>, A. S. Stemberg<sup>3</sup>, I. N. Klotz<sup>4</sup>, T. E. Gvozdik<sup>4</sup>, A. N. Bugay<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia

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

<sup>4</sup>Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

\*E-mail: koshlan@jinr.ru

A study has been performed of cytogenetic violations that occur in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys after local exposure of the hippocampal region to accelerated <sup>78</sup>Kr ions at a dose of 3 Gy. Analysis revealed a low level of chromosomal aberrations in the control group of monkeys. The number of cells with chromosomal aberrations did not exceed 1.67%. The main fraction was chromatid-type aberrations. A cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of monkeys exposed to accelerated krypton ions revealed the maximum level of chromosomal aberrations 24 h after exposure, which exceeded the control level by 2.7 times. By day 96, the number of aberrations decreased 1.7-fold. However, it still exceeded the control level. By 460 days, some animals showed a slight increase in the number of aberrations compared to the previous observation period. In the long term, a number of irradiated animals showed deviations from the standard behavior of monkeys. Data on chromosomal aberrations in blood lymphocytes of monkeys and humans after in vitro irradiation with 170 MeV protons are compared. The relevance of this research is due to the preparation of interplanetary manned flights.

**Keywords:** monkeys, *Macaca mulatta*, accelerated ions, lymphocytes, dicentrics, biological dosimetry, space radiobiology

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кошлань Игорь Владимирович (Koshlan Igor Vladimirovich), koshlan@jinr.ru,  
<https://orcid.org/0009-0000-1591-7418>

Кошлань Наталия Алексеевна (Koshlan Nataliya Alekseevna), nkoshlan@jinr.ru,  
<https://orcid.org/0009-0004-9625-1572>

Мария Исакова (Maria Isakova) isakova@jinr.ru,  
<https://orcid.org/0009-0002-2780-3914>

Мельникова Юлия Владимировна (Melnikova Iulia Vladimirovna), julesmelnikova@mail.ru,  
<https://orcid.org/0009-0000-4731-8874>

Беляева Александра Григорьевна (Belyaeva Alexandra Grigorievna), yasya\_bi@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-6348-1938>

Перевезенцев Александр Александрович (Perevezentsev Alexander Alexandrovich), perezx@me.com,  
<https://orcid.org/0000-0001-6464-2887>

Штемберг Андрей Сергеевич (Andrey Sergeevich Stemberg), andrei\_shtemberg@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-8944-0296>

Клоц Игорь Наумович (Klots Igor Naumovich), igor-imp@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0003-1025-3127>

Гвоздик Татьяна Евгеньевна (Gvozdik Tat'yana Evgen'evna), teg-adler@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-7171-4500>

**Вклад авторов.** Все авторы внесли свой вклад в статью и одобрили представленную версию.

Кошлань И.В.: проект, написание и редактирование статьи, планирование и участие в эксперименте, анализ и интерпретация результатов.

Кошлань Н.А.: планирование и участие в экспериментах, анализ, обработка и интерпретация экспериментальных данных, построение таблиц, рисунков, редактирование текста статьи.

Исакова М.Д.: обработка данных эксперимента, редакция и построение таблиц и рисунков, участие в доработке этой рукописи.

Мельникова Ю.В.: участие в эксперименте, редакция таблиц и рисунков, подготовка материалов, участие в доработке этой рукописи.

Беляева А.Г.: концепция исследования, планирование и участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

Перевезенцев А.А.: участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

Штемберг А.С.: администрирование, концепция исследования, планирование и участие в эксперименте, анализ и обработка полученных данных.

Клоц И.Н.: администрирование, планирование и участие в эксперименте, анализ и обработка полученных данных.

Гвоздик Т.Е.: планирование и участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными.

Бугай А.Н.: администрирование и финансовая поддержка, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

#### **Сведения об отсутствии или наличии конфликта**

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

The authors declare no conflicts of interests.

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 616-03:615.331:539.1.047

**РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА  
НА ОСНОВЕ *Escherichia coli*, ОЦЕНКА БЕЗВРЕДНОСТИ  
И ПРОТИВОРАДИАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ**

© 2024 г. Т. Р. Гайнутдинов<sup>1,2\*</sup>, К. Н. Вагин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

\*E-mail: gtr\_timur@mail.ru

Поступила в редакцию 26.01.2023 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Представлены разработка, оценка безвредности и противорадиационной активности терапевтического средства на основе культуры *Escherichia coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1”. Для получения противорадиационного средства возбудитель колибактериоза выращивали на мясопептонном бульоне в условиях термостата при температуре 37°C в течение 3 сут. Выраженную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 50 мин, надосадочную жидкость сливали. Осадок доводили дистиллированной водой до 1 млрд в см<sup>3</sup>. Из выращенных культур готовили мазки и окрашивали их по Граму для определения чистоты и видовой принадлежности выращенной культуры. Приготовленную взвесь разливали в стерильные флаконы на 10, 50 или 100 см<sup>3</sup>, укупоривали их резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками, маркируя с указанием штамма, дозы облучения и даты. Облучение микробного материала проводили на  $\gamma$ -установке “Исследователь”, источник <sup>60</sup>Со, мощность поглощенной дозы 1.028 Гр/сек, в диапазонах поглощенных доз от 7.5 до 30.0 кГр с междозовыми интервалами 2.5 и 5.0 кГр. Степень инактивации  $\gamma$ -облученных культур *E. coli* определяли путем посева их на мясопептонный агар и термостатирования в течение 168 ч, регистрируя наличие или отсутствие роста микроорганизмов. Проведенными исследованиями установлено, что сроки и степень роста облученных культур *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1” находятся в прямой зависимости от дозы радиационного воздействия, их полная инактивация наступает при облучении в дозе 25.0 кГр. Дальнейшие исследования показали, что разработанный биопрепарат, полученный на базе *E. coli*, стерилен, ареактогенен, нетоксичен и безвреден. Механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения противорадиационных средств на основе *E. coli* штаммов «ПЛ-6» и «КВ-1» заключался в восстановлении гематологических, биохимических и иммунных показателей, что способствовало сохранению от 66.7 до 83.3% летально облученных животных.

**Ключевые слова:** микроорганизм, белые мыши, крысы, облучение, острая лучевая болезнь, биопрепарат, терапия, эффективность, резистентность организма

**DOI:** 10.31857/S0869803124020059, **EDN:** NBFYQE

Ядерные взрывы и радиационные аварии приводят к одновременному или последовательному воздействию на организм сочетанного (внешнего и внутреннего облучения) и комбинированного (радиационно-термического, радиационно-биологического поражения) излучений, в результате которого возникает тяжело протекающий процесс, ведущий к необратимым патологическим изменениям в живом организме [1, 2].

Результатом воздействия ионизирующего излучения на организм является поражение костного мозга и лимфопоэза, в результате чего происходит опустошение иммунокомпетентных клеток, поражаются клеточные и гуморальные звенья иммунной системы. Динамика лимфоцитов

после применения воздействия  $\gamma$ -облучения малыми дозами является изменчивым процессом, мгновенно реагирующим и сохраняющим постоянство. Продолжая наблюдения через год, З.А. Воронцова и В.В. Зюзина (2011) [3] обнаружили повышение числа стромальной и интраэпителиальной клеточной популяции. Согласно литературным данным, у людей, подвергавшихся радиационному воздействию в различные сроки, возникают повреждения иммунной системы организма [4]. Последствия лучевой терапии высоких доз проявляются раньше, чем при воздействии низкими дозами. При действии высоких доз часть лимфоцитов погибают в течение двух дней, открывая ворота различным инфекциям. Исследованиями Е.И. Tolstykh et al. (2013) [5] показано, что

усиление аутоиммунных процессов, изменения иммунологических реакций возникают в результате гипоплазии лимфатических узлов.

О.А. Слюсарева, З.А. Воронцова (2010) [6] отмечают, что тяжесть лучевых поражений определяется скоростью обновления и радиочувствительностью клеток. Повышенная чувствительность клеток к воздействию ионизирующего излучения и нарушение индукции адаптивного ответа в клетках являются проявлением нестабильности генома [7, 8].

Интенсивное развитие радиационной иммунологии, в том числе иммунотерапии и иммунопрофилактики, определило одно из основных направлений: разработку средств терапии при лучевой болезни, способных снижать летальные эффекты ионизирующего излучения, не вызывая в организме при этом побочного действия [9, 10].

Наши предыдущие исследования по изучению противорадиационных средств на основе микроорганизмов показывают их высокую эффективность при терапии лучевой болезни [11].

Механизм формирования радиорезистентности организма на фоне применения препаратов микробной природы реализовался путем усиления эндогенной продукции интерлейкинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), колониестимулирующего фактора (КСФ), туморнекротического фактора (ТНФ- $\alpha$ ) [12, 13], которые регулируют гомопоез, преодолевают миелосупрессию, обеспечивая повышение выживаемости животных [14, 15].

В последнее время для раннего терапевтического эффекта наблюдается смещение акцента в сторону привлечения биологических факторов противолучевой защиты, а именно использование микроорганизмов кишечного-тифозной группы (*E. coli* и др.) [16, 17], обладающих длительным защитным свойством и без проявления побочных эффектов.

Метаболиты кишечной палочки обеспечивают пролонгированную радиорезистентность у летально облученных животных. Микроорганизмы-продуценты при выращивании их на жидкой питательной среде — мясопептонном бульоне (МПБ) — выделяют уникальный набор продуктов метаболизма (бактериоцины, аминокислоты, пробиотические компоненты, лизоцим, ферменты, гормоны, полипептиды), которые обладают антиоксидантным, антибактериальным, метаболиткорректирующим и иммуномодулирующим эффектами, обеспечивая устойчивость макроорганизма к стресс-факторам. Эшерихии в процессе своей жизнедеятельности выделяют антибактериальные вещества (колицины), фермент каталазу и аминокислоты [18].

Вышесказанное стало основанием для разработки средства на основе эшерихий для терапии острой лучевой болезни (ОЛБ), соответственно, целью наших исследований стала разработка способа получения терапевтического средства на основе *Escherichia coli*, оценка его безвредности и противорадиационной активности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Противорадиационное средство микробного происхождения получали, используя производственный штамм *Escherichia coli* штамм (шт.) “ПЛ-6” (эшерихиозной диареи поросят, полученный из коллекции музея штаммов ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”) и патогенный штамм *Escherichia coli* шт. “КВ-1” (эшерихиозной диареи телят, полученный из коллекции музея штаммов ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”). Культуры выращивали на мясопептонном бульоне (МПБ), термостатировали при температуре 37°C в течение 3 сут. Выращенную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40–50 мин, надосадочную жидкость декантировали, осадок доводили дистиллированной водой по стандарту мутности им. Л.А. Тарасевича до 10 ед. (1 млрд/см<sup>3</sup>). Из выращенных культур готовили мазки и окрашивали их по Граму для определения чистоты и видовой принадлежности выращенной культуры.

Приготовленную взвесь разливали в стерильные флаконы на 10, 50 или 100 см<sup>3</sup>, укупоривали их резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками, маркируя с указанием штамма, дозы облучения и даты.

Облучение микробного материала проводили на  $\gamma$ -установке “Исследователь” (Россия), источник <sup>60</sup>Со, мощность поглощенной дозы 1.028 Гр/сек, в диапазонах поглощенных доз от 7.5 до 30.0 кГр с междозовым интервалами 2.5 и 5.0 кГр.

Степень инактивации  $\gamma$ -облученных культур *E. coli* определяли путем высева их на мясопептонный агар (МПА), выращивали в условиях термостата в течение 168 ч, регистрируя наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

Из выращенных культур делали мазки, окрашивали по Граму, микроскопировали под иммерсией с 90-кратным увеличением.

Облученные культуры подвергали микробиологическому анализу, для чего делали серийные разведения в стерильном фосфатном буфере и анализировали с помощью стандартных процедур путем пересева на чашки Петри с МПА. Последние инкубировали в течение 24 ч при 37°C перед подсчетом

колоний на трех чашках Петри с 30–300 колониями и подсчитывали с помощью автоматического счетчика колоний New Brunswick Scientific Rietran II R, среднее число рассчитывали для каждого образца. Рост и концентрацию вышеуказанных штаммов на питательных средах определяли по оптической плотности с помощью прибора фотоэлектроколориметра ФЭК-56М (светофильтр с длиной волны 540 нм).

Радиоинактивированные в дозе 30.0 кГр культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” использовали в качестве противорадиационных средств, в первой серии опытов определяли стерильность в соответствии с Межгосударственным стандартом ГОСТ 28085-2013 [19], путем высева испытуемого средства на питательные среды.

В следующей серии опытов проводили исследования по установлению оптимальной лечебной дозы облученных дозе 30 кГр культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”. Опыты проводили на 120 белых мышах (аутбредные нелинейные мыши, получены из научно-вспомогательного виварного подразделения ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ) обоего пола массой 18–20 г, разделенных на 12 групп, по 10 животных в каждой. Животных подвергали воздействию облучения в дозе 7.7 Гр (ЛД<sub>80/30</sub>) и через 3 сут после облучения однократно подкожно вводили испытуемые лечебное средство по следующей схеме: 1-я группа — 0.1 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “КВ-1”), 2-я — 0.2 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “КВ-1”), 3-я — 0.3 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “КВ-1”), 4-я — 0.4 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “КВ-1”), 5-я — 0.5 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “КВ-1”), 6-я — 0.1 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 7-я — 0.2 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 8-я — 0.3 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 9-я — 0.4 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “ПЛ-6”), 10-я — 0.5 см<sup>3</sup> (*E. coli* шт. “ПЛ-6”). Облученным белым мышам 11-й группы и необлученным 12-й группы средства не вводили, они служили контролем облучения и биологическим контролем соответственно. Оценку результатов исследований проводили по выживаемости животных.

В третьей серии опытов определяли реактогенность, безвредность и токсичность испытуемых средств в соответствии с Межгосударственным стандартом ГОСТ 31926-2013 [20]. Перед проведением испытаний из флаконов облученных дозой 30 кГр культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” готовили смешанную пробу, отбирая из них по 32.5 см<sup>3</sup> средства, и переносили в стерильный флакон, перед применением содержимое флакона тщательно перемешивали.

Для определения реактогенности опыты проводили на 20 белых мышах обоего пола живой массой

18–21 г, разделенных по принципу аналогов на две группы, по 10 животных в каждой. Животным 1-й группы исследуемое средство вводили в дозе 2×10<sup>8</sup> микробных клеток (м.к.) на особь в объеме 0.2 см<sup>3</sup> однократно подкожно. Животным 2-й группы испытуемый образец не вводили, они служили биологическим контролем. Оценку местного действия осуществляли на основании данных ежедневных 7-суточных наблюдений.

Согласно вышеуказанному регламентирующему документу ГОСТ 31926-2013, проводили оценку безвредности и токсичности радиоинактивированных в дозе 30.0 кГр культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1”. Опыты проводили на 110 здоровых белых мышах обоего пола массой 19–21 г, разделенных на 11 групп, по 10 животных в каждой. Перед испытанием смешанную культуру перемешивали и в разных концентрациях вводили животным в объемах 0.1 см<sup>3</sup> (1×10<sup>8</sup> микробных клеток на особь (м.к./особь)) — 1-я группа, 0.2 см<sup>3</sup> (2×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 2-я, 0.3 см<sup>3</sup> (3×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 3-я, 0.4 см<sup>3</sup> (4×10<sup>8</sup> м.к. особь) — 4-я, 0.5 см<sup>3</sup> (5×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 5-я, 0.6 см<sup>3</sup> (6×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 6-я, 0.7 см<sup>3</sup> (7×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 7-я, 0.8 см<sup>3</sup> (8×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 8-я, 0.9 см<sup>3</sup> (9×10<sup>8</sup> м.к./особь) — 9-я, 1.0 см<sup>3</sup> (1×10<sup>9</sup> м.к./особь) — 10-я группа, животным 11-й группы испытуемое средство не вводили, они служили биологическим контролем.

Полученные терапевтические средства в дальнейшем использовали в качестве лечебного средства при острой лучевой болезни.

Опыты по использованию полученных на 1-м этапе работы лечебных средств на основе культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” проводили на белых мышах и крысах обоего пола с живой массой 18–20 и 180–200 г соответственно.

Внешнее тотальное облучение животных проводили на  $\gamma$ -установке “Пума” с мощностью экспозиционной дозы 5.38 Р/мин (2.31×10<sup>-5</sup> А/кг): белых мышей в дозе 7.9 Гр, крыс — 8.0 Гр.

В качестве контрольного препарата использовали противолучевую сыворотку (ПРЛС) с известным защитным эффектом [21].

Эксперименты по оценке противолучевой эффективности разработанных средств лечения проводили на 30 белых мышах, разделенных на пять групп, по шесть животных в каждой. При этом животных первых четырех групп подвергали воздействию  $\gamma$ -облучения в летальной дозе — 7.9 Гр, а животных 5-й группы не облучали и не лечили — они служили биологическим контролем.



Лечение облученных животных с использованием испытуемых средств проводили по следующей схеме. Облученным в дозе 7.9 Гр животным 1-й группы через 3 сут после облучения однократно подкожно в дозе  $1 \times 10^{10}$  м.к./кг вводили облученный в дозе 30 кГр *E. coli* шт. “ПЛ-6”; 2-й — в аналогичных условиях вводили облученный в дозе 30 кГр *E. coli* шт. “КВ-1”; 3-й — лечебное средство ПРЛС подкожно в дозе 50.0 мг/кг (в объеме 0.1 см<sup>3</sup>); 4-я — контроль облучения; 5-я — биологический контроль.

За опытными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение, учитывали клинический статус, выживаемость, рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) павших животных.

На втором этапе работы для подтверждения полученных на белых мышах данных по оценке терапевтической активности испытуемых средств проводили серию опытов на другом виде лабораторных животных — белых крысах. В опытах были использованы 30 белых крыс, разделенных на пять групп по шесть животных в каждой. При этом животных первых четырех групп подвергали  $\gamma$ -облучению в летальной дозе (8.0 Гр), животных 5-й группы не облучали и не лечили — они служили биологическим контролем.

Лечение облученных белых крыс с использованием испытуемых средств проводили по следующей схеме. Облученным в дозе 8.0 Гр животным 1-й группы через 3 сут после облучения однократно подкожно в дозе  $2 \times 10^9$  м.к./особь в объеме 2.0 см<sup>3</sup> вводили лечебное средство на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр; 2-й в аналогичных условиях — *E. coli* шт. «КВ-1», облученный в дозе 30 кГр; 3-й в аналогичных условиях — ПРЛС подкожно в дозе 50 мг/кг (в объеме 1.0 см<sup>3</sup>); 4-я — служила контролем облучения; 5-я — биологическим контролем.

Наблюдение за опытными и контрольными животными вели ежедневно в течение 30 дней, изучали клинические (общее состояние, выживаемость, средняя продолжительность жизни павших животных), гематологические показатели (содержание форменных элементов периферической крови, уровень гемоглобина, общего белка), состояние клеточных (содержание Т- и В-лимфоцитов) факторов иммунитета, уровень малонового диальдегида. Кровь для исследований у животных отбирали из хвостовой вены в области средней трети хвостовых позвонков на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки после облучения.

Иммунный статус животных определяли по состоянию клеточного и гуморального иммунитета. Состояние клеточного (Т-, В-лимфоциты) звеньев

иммунитета оценивали по методу розеткообразования, который основан на взаимодействии мембранных рецепторов Т- и В-лимфоцитов с эритроцитами, что при микроскопировании визуально определяется в виде розеткообразования, когда к поверхности лимфоцитов присоединены три и более эритроцитов. С помощью варьирования режимов розеткообразования идентифицируются Т- и В-лимфоциты с определенными свойствами, отражающие дифференцированность и функциональную принадлежность. Для определения регуляторных субпопуляций использовали нагрузочные тесты с теофиллином. Теофиллинрезистентные лимфоциты составили субпопуляцию Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью, а теофиллинчувствительные — супрессорной активностью. Для получения данных использовали метод розеткообразования с эритроцитами барана для Т-клеток, а для получения В-клеток применяли метод ЕАС-розеток. Количество 0-клеток, не имеющих ни Т-, ни В-маркеров, определяли расчетным методом по формуле: 0-клетки % = 100% – (Е-РОК % + МРОК %) [22].

О степени интенсивности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению вторичных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА), реакция которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) положена в основу одного из самых распространенных методов изучения ПОЛ в биологических системах (М.С. Гончаренко и А.М. Латина [23] в модификации В.А. Гурьяновой и Е.И. Трошина [24]). Количественные методы определения ПОЛ регистрировали по разности в концентрации радикальных предшественников (по изменению оптической плотности) до и после их окислительной деградации.

Проведение экспериментов на лабораторных животных осуществляли с использованием регламентированных и описанных в научной литературе методов и способов гуманного отношения к животным в соответствии с законодательством и правовыми актами РФ, Хельсинкской Декларации (1969), рекомендации комитета по этике ВОЗ (Протокол ЛЭК № 11 от 28 февраля 2023 г.).

Полученный в ходе экспериментов цифровой материал гематологических и иммунологических исследований подвергали статистической обработке с использованием общепринятых методов, степень достоверности различий между сравнительными показателями определяли по критерию Стьюдента, а выживаемость животных — по точному критерию Фишера. Цифровые данные, полученные в экспе-

**Таблица 1.** Интенсивность роста облученной культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6” на мясопептонном агаре  
**Table 1.** Growth rate of irradiated *E. coli* culture strain “PL-6” on meat-peptone agar

Доза облучения, кГр	Интенсивность роста, ч						
	24	48	72	96	120	144	168
7.5	+	++	++	++	+++	+++	+++*
10.0	+	++	++	++	++	+++	+++*
12.5	+	++	++	++	++	+++	+++*
15.0	+	+	+	+	++	++	++*
17.5	+	+	+	+	+	++	++*
20.0	—	+	+	+	+	+	++*
25.0	—	—	—	—	—	—	—
30.0	—	—	—	—	—	—	—
Контроль (необлученная культура)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*

Примечание. (—) — отсутствие роста; (+) — слабый рост; (++) — умеренный рост; (+++) — обильный рост; (\*) — сделан мазок.

рименте, обработаны биометрически на персональном компьютере с использованием прикладной программы GraphPadPrismv 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенными исследованиями показано, что сроки и степень роста облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” находятся в прямой зависимости от дозы радиационного воздействия, их полная инактивация наступает при облучении в дозе 25.0 кГр (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что культура *E. coli* шт. “ПЛ-6” устойчива к воздействию ионизирующей радиации.  $\gamma$ -Облучение в дозе от 7.5 до 12.5 кГр сдерживает рост в течение суток после посева. Облучение их в дозе 15.0 и 17.5 кГр ингибирует развитие культуры, проявляющееся в слабом росте в первые 4 и 5 сут после посева. При воздействии облучения в дозе 20.0 кГр рост появляется на 2-е сут и идет слабо от 48 до 144 ч после посева. На 6-е сут после посева обильный рост наблюдался у образцов, облученных в дозах 7.5 и 15.0 кГр, умеренный — при дозах 15.0 и 17.5 кГр и слабый — при дозе 20.0 кГр, отсутствие — при дозах 25.0 и 30.0 кГр.

Результаты параллельных радиомикробиологических исследований с использованием вирулентного шт. *E. coli* “КВ-1” представлены в табл. 2.

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что *E. coli* шт. “КВ-1” менее устойчив к воздействию  $\gamma$ -лучей, чем “ПЛ-6”, что выражается в более отчетливом угнетении роста культуры в первые сутки после посева облученного в дозах от 7.5 до 15.0 кГр

материала, умеренном — при дозе 7.5 кГр и обильном — в контрольном образце. Облучение в диапазонах доз от 6 сут после посева, 17.5 кГр — от 48 до 144 ч, 20.0 кГр — от 72 до 144 ч. На 7-е сут выращивания культуры, подвергнутой облучению в дозах 7.5 и 10 кГр, наблюдали обильный рост, в пробах, облученных от 12.5 до 17.5 кГр, — умеренный рост и в дозе 20.0 кГр — слабый. Отсутствие роста отмечено в пробах, облученных в дозах 25.0 и 30.0 кГр.

При микроскопии мазков, сделанных из необлученных и облученных в разных диапазонах дозах культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6” выявили грам-отрицательные, неспорообразующие палочки, располагающиеся в мазках одиночно.

Для определения контаминации микроорганизмами и грибами смешенную радиоинaktivированную культуру высевали на жидкие питательные среды: Сабуро, МПБ и МППБ (среда Китта–Тароцци) и на твердые питательные среды: Сабуро, МПА. На посев использовали по три пробирки и две чашки Петри с питательной средой на каждую пробу, в которые вносили по 1.0 см<sup>3</sup> испытуемых лекарственных средств. Из отобранных флаконов в среду Китта–Тароцци высевали по 1.0 см<sup>3</sup> в две пробирки вместимостью 10–12 см<sup>3</sup> и по 5 см<sup>3</sup> в два флакона объемом 100 см<sup>3</sup>. Для определения контаминации микоплазмами каждую пробу средства по 10 см<sup>3</sup> вносили в 100 см<sup>3</sup> флаконы с жидкой средой Хейфлика, а также по 0.2 см<sup>3</sup> на четыре чашки Петри с аналогичной твердой питательной средой.

Пробирки и флаконы с посевами на всех средах, кроме среды Сабуро, выдерживали в термостате при

**Таблица 2.** Интенсивность роста облученной культуры *E. coli* штамм “КВ-1” на мясопептонном агаре  
**Table 2.** Growth rate of irradiated *E. coli* culture strain “KV-1” on meat-peptone agar

Доза облучения, кГр	Интенсивность роста, ч						
	24	48	72	96	120	144	168
7.5	+	++	++	++	++	+++	+++*
10.0	+	+	++	++	++	++	+++*
12.5	+	+	+	++	++	++	+++*
15.0	+	+	+	+	+	+	+++*
17.5	—	+	+	+	+	+	+++*
20.0	—	—	+	+	+	+	+*
25.0	—	—	—	—	—	—	—
30.0	—	—	—	—	—	—	—
Контроль (необлученная культура)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*

Примечание. (—) — отсутствие роста; (+) — слабый рост; (++) — умеренный рост; (+++) — обильный рост; (\*) — сделан мазок.

температуре 37°C, среду Хейфлика — в микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего 5–10% диоксида углерода), а среду Сабуро — при комнатной температуре (22.5 ± 2.5)°C, в течение 14 сут, за исключением жидкой среды Хейфлика, инкубировали 20–21 день. Одновременно в тех же условиях инкубировали по одному флакону, содержащему 100 см<sup>3</sup>, и по две чашки Петри со средой Хейфлика — контроль стерильности питательной среды.

На 3-й день после посева проводили пересев материала от каждой жидкой среды Хейфлика в количестве не менее 0.2 см<sup>3</sup> на две чашки Петри каждой твердой указанной среды. Пересев повторяли на 7, 14 и 20-й дни испытания. Пересевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (используя прибор анаэроустат) в течение 21 дня.

По истечении 14 сут наблюдения в изучаемых жидких и твердых питательных средах роста отмечено не было. Согласно регламентированному стандарту ГОСТ 28085-2013 [19], делали пересев из указанных сред на МПБ, среду Китта–Тароцци, жидкую и твердую среду Сабуро в тех же объемах и условиях, что и при посеве, вторичные посевы выдерживали в течение 14 сут.

По истечении периода наблюдений роста микроорганизмов, грибов и микоплазм отмечено не было, что свидетельствует об их стерильности.

Результаты проведенных опытов по установлению оптимальной лечебной дозы лечебных средств на основе культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”, облученных дозой 30 кГр, показали, что выживаемость

летально облученных белых мышей в 1-й группе составляла 60%, во 2-й — 70%, в 3-й — 70%, в 4-й — 70%, в 5-й — 60%, в 6-й — 50%, в 7-й — 60%, в 8-й — 60%, в 9-й — 60%, в 10-й — 50%, в 11-й — 20% и в 12-й — 100%.

Таким образом, оптимальная лечебная доза разрабатываемого противорадиационного лечебного средства — 0.2 см<sup>3</sup>, которая содержит 2 × 10<sup>8</sup> м.к. *E. coli*. В пересчете на 1 кг живой массы доза средства составляет 0.1 × 10<sup>9</sup> м.к./кг.

Проведенными клиническими испытаниями доказано, что разработанные лечебные средства на основе культур *E. coli* шт. “КВ-1” и “ПЛ-6”, облученных дозой 30 кГр, не обладают реактогенной активностью. При ежедневном визуальном наблюдении у животных, которым применяли лечебные средства в указанных дозах (2 × 10<sup>8</sup> м.к./особь в объеме 0.2 см<sup>3</sup>), никаких реакций не выявлено: животные были активны, охотно принимали корм и воду, адекватно реагировали на естественные раздражители.

Результаты проведенных опытов по определению токсичности показали, что испытуемые инактивированные  $\gamma$ -облучением в дозе 30.0 кГр бактериальные культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” при подкожном введении в объемах от 0.1 до 1.0 см<sup>3</sup>, содержащие от 100 млн до 1 млрд м. к., не оказывали неблагоприятного воздействия на животных, не вызывали гибели их в течение 14 сут наблюдения, т. е. предлагаемые лечебные средства не токсичны, а также в ходе исследований доказано, что данные биопрепараты безвредны, так как введение их

**Таблица 3.** Терапевтические свойства разработанных биопрепаратов в опытах на белых мышах,  $n = 6$   
**Table 3.** Therapeutic properties of the developed biological products in experiments on white mice,  $n = 6$

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	<i>E. coli</i> штамм “ПЛ-6” — 30	$2 \times 10^8$ м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	10.0	50.0
2	<i>E. coli</i> штамм “КВ-1” — 30	$2 \times 10^8$ м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	13.0	66.7*
3	ПРЛС	1.0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	10.0	50.0
4	Контроль облучения	—	—	крайне тяжелая	9.8	0
5	Биологический контроль	—	—	—	—	100

Примечание. Статистически значимое различие по отношению к группе контроля облучения при \* —  $p < 0.05$  по точному критерию Фишера; СПЖ — средняя продолжительность жизни; ПРЛС — противолучевая сыворотка; 1-кратно — однократное введение; п/к — подкожно; 1-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр и через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе  $1 \times 10^{10}$  м.к./кг введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6”; 2-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр, через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе  $1 \times 10^{10}$  м.к./кг введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “КВ-1”; 3-я группа — облучение животных в дозе 7.9 Гр, через 3 сут после воздействия введение ПРЛС подкожно в дозе 1.0 мг/особь (в объеме 0.1 см<sup>3</sup>); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

опытным животным в 2–4-кратной дозе не вызывало никаких изменений клинических признаков и гибели животных в течение периода наблюдения (14 сут).

Результаты опытов по изучению противорадиационной эффективности разработанных лечебных средств на основе облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1” представлены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 данных видно, что полученные потенциальные противорадиационные микробные средства на основе *E. coli* оказывали противорадиационную активность. Из них лечебное средство на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6” и контрольный препарат ПРЛС (варианты 1, 3) обеспечивали 50%-ную выживаемость, одно средство на основе *E. coli* шт. “КВ-1” (вариант 2) — обладало максимальной противорадиационной активностью, вылечивая животных от крайне тяжелой степени ОЛБ в 66.7% случаев ( $p = 0.038$ ,  $p < 0.05$  по отношению к группе контроля облучения).

У животных группы контроля облучения (4-я группа) наблюдалась острая лучевая болезнь (ЛД<sub>100/30</sub>) крайне тяжелой степени со 100%-ной летальностью облученных животных при средней продолжительности жизни павших мышей 9.8 сут. Применение испытуемых средств оказывало модифицирующее действие на течение, степень тяжести, исход болезни и выживаемость животных.

Установлено, что однократное подкожное введение радиоинактивированного  $\gamma$ -лучами возбудителя колибактериоза, облученного в дозе 30 кГр (1-я, 2-я группа), а также ПРЛС (3-я группа) значительно

облегчали течение ОЛБ, степень ее проявления, срок продолжительности жизни (СПЖ), выживаемость животных. Показано, что применение указанных средств переводит крайне тяжелое течение острой лучевой болезни в тяжелое, увеличивая выживаемость от 50 до 66.6% и срок продолжительности жизни — от 10 до 17 сут, что превышает контрольный уровень до 1.7 раза.

Результаты второго этапа работы по оценке терапевтической активности испытуемых средств, проведенные на белых крысах, представлены в табл. 4.

Из представленных в табл. 4 данных видно, что острая лучевая болезнь у крыс 4-й группы, которым лечебные средства не применяли, протекала тяжело в костномозговой форме с падежом животных на 2, 4, 6, 9, 11-е сут со СПЖ 6.4 сут, выживаемость животных в данной группе составила 16.7%.

Применение лечебных средств приводило к облегчению течения ОЛБ, переводя тяжелую степень болезни в среднюю и значительно увеличивая СПЖ павших белых крыс.

При применении разработанного лечебного средства *E. coli* шт. “ПЛ-6”-30 и контрольного препарата (ПРЛС) (1-я, 3-я группа) оказывало облегчающее действие на течение острой лучевой болезни, значительно повышая выживаемость животных до 66.7% при СПЖ до 11.5–12.5 сут.

Наиболее высоким противорадиационным свойством обладало средство микробного происхождения: радиоинактивированный возбудитель

**Таблица 4.** Выживаемость облученных белых крыс, подвергнутых лечению разработанными биопрепаратами на основе облученных культур *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1”,  $n = 6$

**Table 4.** Survival rate of irradiated white rats treated with developed biologics based on irradiated cultures of *E. coli* strains “PL-6” and “KV-1”,  $n = 6$

Группа опыта	Лечебное средство	Доза препарата на особь	Способ применения	Степень тяжести болезни	СПЖ, сут	Выживаемость, %
1	<i>E. coli</i> штамм “ПЛ-6” — 30	$2 \times 10^9$ м.к.	1-кратно п/к	тяжелая	12.5	66.7
2	<i>E. coli</i> штамм “КВ-1” — 30	$2 \times 10^9$ м.к.	1-кратно п/к	средняя	14.0	83.3*
3	ПРЛС	10.0 мг	1-кратно п/к	тяжелая	11.5	66.7
4	Контроль облучения	—	—	тяжелая	6.4	16.7
5	Биологический контроль	—	—	—	—	100

Примечание. Статистически значимое различие по отношению к группе контроля облучения при \* —  $p < 0.05$  по точному критерию Фишера; СПЖ — средняя продолжительность жизни; ПРЛС — противолучевая сыворотка; 1-кратно — однократное введение; п/к — подкожно; 1-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр и через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе  $2 \times 10^9$  м.к./особь (в объеме 2.0 см<sup>3</sup>) введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6”; 2-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия, однократно подкожно в дозе  $2 \times 10^9$  м.к./особь (в объеме 2.0 см<sup>3</sup>) введение культуры *E. coli* штамм “КВ-1” облученной в дозе 30 кГр; 3-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия введения ПРЛС подкожно в дозе 10 мг/особь (в объеме 1.0 см<sup>3</sup>); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

колибактериоза, облученный в дозах 30 кГр (2-я группа), модифицирующий тяжелую степень течения болезни в среднюю, увеличивая выживаемость до 83.3%, а также СПЖ павших животных до 14 сут, что значительно превышало показатели контрольных животных ( $p = 0.03$ ,  $p < 0.05$  по отношению к группе контроля облучения).

Общее состояние крыс группы биологического контроля в течение всего срока исследований (30 сут) было удовлетворительным. Они адекватно реагировали на внешние раздражители, активно передвигались по клетке, хорошо поедали корм. Кожный покров был гладким и блестящим. Случаев гибели не наблюдалось.

В табл. 5 и 6 представлены результаты исследования периферической крови  $\gamma$ -облученных и леченных белых крыс разработанными биопрепаратами на основе облученных культур *E. coli* шт. “ПЛ-6” и “КВ-1”.

Данные, представленные в табл. 5, показывают, что выраженной реакцией организма на  $\gamma$ -облучение является изменение числа клеток белой крови. Как видно из таблицы, через 3 сут после облучения у животных опытных групп наблюдалось достоверное, по сравнению с контролем, снижение общего количества лейкоцитов, которое продолжалось на протяжении всего периода исследований.

Наименьшее количество клеток белой крови наблюдали на 14-е сутки опыта: составляло у животных группы контроля облучения  $3.05 \pm$

$0.42 \times 10^9$ /л ( $p < 0.001$ ) против  $10.50 \pm 0.24 \times 10^9$ /л биологического контроля. На всем протяжении эксперимента у крыс, подвергнутых воздействию  $\gamma$ -излучения и лечению разработанными средствами, наблюдали увеличение количества лейкоцитов по сравнению с группой контроля облучения, но в сравнении с группой биологического контроля количество лейкоцитов у леченых животных во все сроки опыта было ниже, и к концу исследований (28 сут) количество лейкоцитов в крови этих животных не доходило до уровня группы биологического контроля.

Изменения количества эритроцитов и гемоглобина у животных облученного контроля в течение первых суток после облучения были незначительными. В период с 7-х по 14-е сутки изменения со стороны красной крови у этих животных носили более выраженный и достоверный характер. Максимальное проявление анемии наблюдалось на 14-е сутки опыта, количество эритроцитов составило  $6.03 \pm 0.35 \times 10^{12}$ /л, а гемоглобина —  $109.17 \pm 2.03$  г/л против данных биологического контроля  $7.17 \pm 0.34 \times 10^{12}$ /л и  $126.50 \pm 1.83$  г/л соответственно. Изменения количества эритроцитов у леченых крыс не имели различий с группой биологического контроля. Концентрация гемоглобина у леченых животных снижалась до 14-х суток исследований. Начиная с 21-х суток опыта у леченых животных концентрация гемоглобина в крови возрастала, но исходного уровня не достигала.

Показатель гематокрита у крыс группы контроля облучения в период с 3-х сут по 14-е сутки опыта достоверно снижался, с небольшим повышением на 7-е сутки. Этот показатель у леченых животных незначительно снижался на 14-е сутки в сравнении с уровнем биологического контроля. Минимальное

значение этого показателя в группе контроля облучения отмечено на 14-е сутки после облучения и составило  $28.17 \pm 0.66\%$  при  $36.17 \pm 0.72\%$  в биологическом контроле, а в группе с применением лечебного средства на основе *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр, этот показатель составлял

Таблица 5. Показатели крови белых крыс в разные сроки после  $\gamma$ -облучения и лечения,  $n = 6$

Table 5. Blood parameters of white rats at different times after gamma irradiation and treatment,  $n = 6$

Срок после облучения, сут	Группа опыта	Показатели				
		гемоглобин, г/л	эритроциты, $10^{12}/л$	лейкоциты, $10^9/л$	гематокрит, %	общий белок, г/л
3	1	$123.67 \pm 3.51$	$6.72 \pm 0.36$	$4.28 \pm 0.23^{***}$	$35.83 \pm 0.82$	$66.33 \pm 0.23^{**}$
	2	$125.33 \pm 3.56$	$6.77 \pm 0.38$	$4.47 \pm 0.29^{***}$	$35.50 \pm 0.47^*$	$65.95 \pm 0.52^{**}$
	3	$121.60 \pm 2.53^*$	$6.70 \pm 0.35$	$4.12 \pm 0.22^{***}$	$35.50 \pm 0.47^*$	$66.02 \pm 0.28^{***}$
	4	$119.40 \pm 3.14^{**}$	$6.67 \pm 0.37$	$3.67 \pm 0.37^{***}$	$33.33 \pm 0.73^{***}$	$63.12 \pm 0.31^{***}$
	5	$128.83 \pm 2.27$	$6.83 \pm 0.52$	$9.67 \pm 0.37$	$36.67 \pm 0.23$	$69.83 \pm 0.87$
7	1	$116.00 \pm 5.51^*$	$6.88 \pm 0.42$	$4.33 \pm 0.30^{***}$	$36.67 \pm 0.46$	$69.50 \pm 0.47$
	2	$116.83 \pm 4.27^*$	$7.00 \pm 0.43$	$4.50 \pm 0.31^{***}$	$36.83 \pm 0.44$	$69.85 \pm 0.34$
	3	$115.50 \pm 4.21^{**}$	$6.83 \pm 0.42$	$4.18 \pm 0.38^{***}$	$36.17 \pm 0.66$	$68.28 \pm 0.93$
	4	$110.50 \pm 4.99^{**}$	$6.45 \pm 0.56$	$3.72 \pm 0.37^{***}$	$34.17 \pm 0.44^{**}$	$61.28 \pm 0.74^{***}$
	5	$129.67 \pm 2.59$	$7.00 \pm 0.40$	$9.83 \pm 0.44$	$36.33 \pm 0.37$	$69.50 \pm 1.29$
14	1	$113.83 \pm 4.28^*$	$6.41 \pm 0.31$	$3.93 \pm 0.22^{***}$	$32.50 \pm 0.47^{***}$	$66.98 \pm 0.74^{***}$
	2	$114.67 \pm 3.09^{**}$	$6.65 \pm 0.41$	$4.13 \pm 0.09^{***}$	$32.83 \pm 0.34^{***}$	$67.02 \pm 0.58^{***}$
	3	$113.67 \pm 3.47^{**}$	$6.20 \pm 0.33$	$3.80 \pm 0.19^{***}$	$32.17 \pm 0.34^{***}$	$66.95 \pm 0.85^{**}$
	4	$109.17 \pm 2.03^{***}$	$6.03 \pm 0.35^*$	$3.05 \pm 0.42^{***}$	$28.17 \pm 0.66^{***}$	$58.78 \pm 0.52^{***}$
	5	$126.50 \pm 1.83$	$7.17 \pm 0.34$	$10.50 \pm 0.24$	$36.17 \pm 0.72$	$70.67 \pm 0.54$
21	1	$114.00 \pm 2.48^{***}$	$6.67 \pm 0.39$	$5.87 \pm 0.23^{***}$	$36.83 \pm 0.44$	$69.15 \pm 0.34$
	2	$114.83 \pm 2.37^{**}$	$6.72 \pm 0.38$	$5.92 \pm 0.24^{***}$	$36.92 \pm 0.50$	$69.52 \pm 0.47$
	3	$113.87 \pm 1.51^{***}$	$6.48 \pm 0.43$	$5.70 \pm 0.38^{***}$	$36.50 \pm 0.47$	$68.78 \pm 0.50$
	4	—	—	—	—	—
	5	$129.00 \pm 2.81$	$6.83 \pm 0.44$	$10.33 \pm 0.37$	$36.50 \pm 0.68$	$70.02 \pm 0.94$
28	1	$117.17 \pm 1.43^{**}$	$6.74 \pm 0.46$	$7.00 \pm 0.43^{***}$	$36.05 \pm 0.29$	$69.28 \pm 0.41$
	2	$117.50 \pm 2.35$	$6.92 \pm 0.43$	$7.07 \pm 0.45^{***}$	$36.13 \pm 0.59$	$69.67 \pm 0.48$
	3	$116.50 \pm 1.74^{**}$	$6.66 \pm 0.39$	$6.93 \pm 0.38^{***}$	$35.83 \pm 0.52$	$69.25 \pm 0.68$
	4	—	—	—	—	—
	5	$128.67 \pm 3.16$	$7.00 \pm 0.40$	$10.17 \pm 0.44$	$36.17 \pm 0.34$	$70.25 \pm 0.34$

Примечание. Данные представлены в виде: среднее арифметическое  $\pm$  средняя квадратическая ошибка ( $M \pm m$ ). Статистически значимое различие по отношению к контрольной 5 группе при \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$  по критерию Стьюдента; 1-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр и через 3 сут после воздействия однократно подкожно в дозе  $2 \times 10^9$  м.к./особь (в объеме 2.0 см<sup>3</sup>) введение культуры *E. coli* штамм “ПЛ-6” облученной в дозе 30 кГр; 2-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия однократно подкожно в дозе  $2 \times 10^9$  м.к./особь (в объеме 2.0 см<sup>3</sup>) введение облученной в дозе 30 кГр культуры *E. coli* штамм “КВ-1”; 3-я группа — облучение животных в дозе 8.0 Гр, через 3 сут после воздействия подкожное введение противолучевой сыворотки (ПРЛС) в дозе 10 мг/особь (в объеме 1.0 см<sup>3</sup>); 4-я группа — контроль облучения; 5-я группа — биологический контроль.

32.50 ± 0.47 %, лечебного средства на основе *E. coli* шт. “КВ-1” облученного в дозе 30 кГр — 32.83 ± 0.34%, контрольное лечебное средство ПРЛС — 32.17 ± 0.34%.

Содержание общего белка в сыворотке крови животных в группе контроля облучения в течение первых трех суток достоверно снижалось 63.12 ± 0.31 г/л ( $p < 0,001$ ) с минимальным значением на 14-е сутки после  $\gamma$ -воздействия 58.78 ± 0.52 г/л ( $p < 0.001$ ) по сравнению с группой биологического контроля

70.67 ± 0.54 г/л. У леченых животных эти показатели были выше, чем в группе контроля облучения, и на указанный срок составляли в 1-й группе 66.98 ± 0.74 г/л, во 2-й — 67.02 ± 0.58 г/л, в 3-й — 66.95 ± 0.85 г/л.

Таким образом, изменения морфологического состава периферической крови  $\gamma$ -облученных крыс характеризовались развитием выраженной лейкопении и анемии. У леченых животных изменения показателей эритроцитов были менее выраженными.

**Таблица 6.** Показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов у белых крыс при облучении и применении лечебных средств,  $n = 6$

**Table 6.** Indicators of the immune system and lipid peroxidation in white rats under irradiation and the use of medicinal products,  $n = 6$

Срок после облучения, сут	Группа опыта	Т-клетки, %	В-клетки, %	МДА, нмоль/мл	
				гемолизат	плазма
3	1	14.17 ± 0.44***	5.55 ± 0.53***	7.15 ± 0.61×	8.05 ± 0.47
	2	14.50 ± 0.24***	5.75 ± 0.33***	7.07 ± 0.76*	8.00 ± 0.75
	3	13.88 ± 0.15***	5.23 ± 0.34***	7.18 ± 0.64*	8.10 ± 0.40
	4	11.62 ± 0.56***	4.40 ± 0.40***	7.55 ± 0.67**	8.18 ± 0.34
	5	28.67 ± 0.46	9.67 ± 0.43	5.05 ± 0.43	6.88 ± 0.53
7	1	14.95 ± 0.55***	4.88 ± 0.66***	6.08 ± 0.64	8.55 ± 0.36*
	2	15.00 ± 0.35***	4.95 ± 0.5***	6.03 ± 0.77	8.52 ± 0.62
	3	14.12 ± 0.26***	4.73 ± 0.39***	6.07 ± 0.61	8.60 ± 0.53
	4	11.73 ± 0.5***	3.73 ± 0.34***	7.88 ± 0.42*	9.02 ± 0.56*
	5	28.17 ± 0.34	9.50 ± 0.84	5.43 ± 0.75	7.02 ± 0.61
14	1	13.45 ± 0.69***	4.38 ± 0.84***	6.58 ± 0.83	8.92 ± 0.29**
	2	13.38 ± 0.48***	4.45 ± 0.71***	6.70 ± 0.69	8.88 ± 0.7*
	3	13.28 ± 0.68***	4.23 ± 0.6***	6.57 ± 0.81	8.95 ± 0.48*
	4	9.40 ± 0.25***	2.90 ± 0.35***	8.05 ± 0.37**	9.68 ± 0.68**
	5	28.50 ± 0.55	9.92 ± 0.44	5.15 ± 0.70	6.98 ± 0.51
21	1	17.62 ± 0.32***	5.25 ± 0.49***	5.92 ± 0.64	8.62 ± 0.72
	2	17.80 ± 0.43***	5.45 ± 0.21***	5.75 ± 0.77	8.42 ± 0.60
	3	17.28 ± 0.25***	5.30 ± 0.19***	5.90 ± 0.67	8.65 ± 0.90
	4	—	—	—	—
	5	28.17 ± 0.34	9.83 ± 0.82	5.12 ± 0.87	6.93 ± 0.79
28	1	20.50 ± 0.42***	7.45 ± 0.39*	5.75 ± 0.74	6.92 ± 0.76
	2	20.80 ± 0.49***	7.80 ± 0.32*	5.57 ± 0.78	6.90 ± 0.70
	3	20.12 ± 0.34***	7.22 ± 0.50*	5.50 ± 0.84	6.95 ± 0.54
	4	—	—	—	—
	5	28.57 ± 0.33	9.77 ± 0.75	5.33 ± 0.78	7.03 ± 0.46

Примечание. Условные обозначения согласно табл. 5.

Восстановление количества лейкоцитов и гемоглобина происходило медленно и продолжалось вплоть до конца исследований. При этом во все сроки исследований у животных, леченных разработанными лечебными средствами, количество лейкоцитов было выше по сравнению с группой контроля облучения.

Результаты исследований показателей системы иммунитета и интенсивности процесса перекисного окисления липидов у облученных и леченых белых крыс представлены в табл. 6.

Из данных таблицы видно, что у облученных белых крыс группы контроля облучения происходит резкое снижение количества Т- и В-лимфоцитов, максимальное снижение зарегистрировано на 14-е сут исследований и составляло  $9.40 \pm 0.25\%$  против  $28.50 \pm 0.55\%$  уровня биологического контроля.

У животных, леченных разработанными лечебными средствами, также отмечалось снижение количества Т-клеток, но оно носило менее выраженный характер, чем в группе контроля облучения. Минимум количества Т-клеток у животных данной группы отмечен к 14-м суткам и составлял  $13.45 \pm 0.69\%$ ,  $13.38 \pm 0.48\%$ ,  $13.28 \pm 0.68\%$ , что на 47.2, 46.9 и 46.6% ниже значения интактных животных. В дальнейшем происходило восстановление количества Т-лимфоцитов, но даже к концу срока исследований (28 сут) в этих группах уровень Т-клеток полностью не восстанавливался до уровня биологического контроля. Количество В-лимфоцитов поражалось аналогично Т-лимфоцитам. Минимум количества В-лимфоцитов в опытных группах отмечен на 14-е сут. Восстановление содержания В-клеток в периферической крови в общих чертах напоминает те же закономерности, которые проявляются при восстановлении Т-лимфоцитов. К концу срока исследований популяция В-клеток также полностью не восстанавливалась.

Результаты исследований интенсивности процесса перекисного окисления липидов по содержанию в периферической крови у подвергнутых воздействию  $\gamma$ -излучения и интактных крыс малонового диальдегида, показали, что в группе облученного контроля происходит достоверное возрастание показателя перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови, начиная с первых суток в плазме  $8.18 \pm 0.34$  нмоль/мл при  $6.88 \pm 0.53$  нмоль/мл в исходке, в гемолизате —  $7.55 \pm 0.67$  нмоль/мл ( $p < 0.01$ ) при  $5.05 \pm 0.43$  нмоль/мл в группе биологического контроля. На 7-е сутки эксперимента количество малонового диальдегида возрастало: значительное повышение отмечено на 14–21-е сутки опыта. Максимальное повышение этого пока-

зателя в группе облученного контроля приходило на 14-е сутки и составило в плазме крови  $9.68 \pm 0.68$  нмоль/мл ( $p < 0.01$ ) при  $6.98 \pm 0.51$  нмоль/мл в группе биологического контроля, в гемолизате эритроцитов —  $8.05 \pm 0.37$  нмоль/мл ( $p < 0.01$ ) при  $5.15 \pm 0.70$  нмоль/мл в контрольной группе.

Облучение вызывало у всех контрольных животных, а также леченых крыс выраженные изменения в периферической крови. Однако, несмотря на сходный характер этих изменений, между контрольными и лечеными животными наблюдались определенные различия, проявлявшиеся в меньшем снижении количества лейкоцитов и других показателей крови и более раннем и выраженном восстановлении их у леченых животных. Введение разработанных лечебных средств облученным животным вызывало у них более медленное снижение числа лейкоцитов в периферической крови. Выживаемость крыс при этом составила до 83.3% при ЛД<sub>83.3–100</sub> гибели в группе контроля облучения.

Таким образом, проведенными исследованиями на лабораторных животных установлено, что наиболее высокой противорадиационной эффективностью обладает разработанное лечебное средство микробного происхождения на основе *E. coli* шт. “КВ-1”, облученного в дозе 30 кГр, обеспечивающий 83.3 %-ную выживаемость против 66.6 %, лечебного средства *E. coli* шт. “ПЛ-6”, облученного в дозе 30 кГр, регламентированного средства (ПРЛС) — 66.6% и контроля облучения — 16.7%. При этом СПЖ животных увеличивалось до 14 сут (лечебное средство на основе *E. coli* шт. “КВ-1”, облученный в дозе 30 кГр) против 6.4 — у контроля облучения.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При получении бактериальных радиозащитных средств руководствовались ранее использованными нами методами и приемами выращивания и инактивации биологического материала [25].

Оценку радиозащитной эффективности изучали на лабораторных животных (белых мышах и крысах). При выборе дозы внешнего  $\gamma$ -облучения, вызывающей лучевую болезнь тяжелой степени, руководствовались результатами предыдущих собственных исследований [11, 25], а также литературными данными [26].

Проведенными экспериментами установлено, что подкожное введение радиозащитных инактивированных  $\gamma$ -облучением средств микробного происхождения наиболее эффективно при



условии инъекции их через 3 сут после радиационного воздействия. Наши данные, касающиеся сроков введения радиопротективных средств, отчасти согласуются с литературными данными [27–29].

Изучение противолучевой эффективности испытуемых инактивированных  $\gamma$ -облучением средств микробного происхождения показало, что они обладают высокими терапевтическими свойствами. Введение радиоинактивированных культур *E. coli* шт. “КВ-1” предотвращало гибель до 80% всех облученных мышей и до 60% – при условии инъекции им инактивированной культуры *E. coli* шт. “ПЛ-6”.

Полученные данные по выживаемости вполне согласуются с результатами исследований по оценке радиозащитной эффективности инактивированных культур микроорганизмов [28, 30].

В опытах на белых мышах и белых крысах по определению эффективности испытуемых противолучевых средств при радиационном поражении показано, что испытуемые образцы микробного происхождения *E. coli* шт. “КВ-1”, *E. coli* шт. “ПЛ-6”, подвергнутые воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 30 кГр, обладают высокими лечебными свойствами при условии парентерального введения их через 3 сут после радиационного воздействия.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено, что инактивация микроорганизмов *E. coli* штаммов “ПЛ-6” и “КВ-1”  $\gamma$ -излучением приводит к снижению вирулентности, токсичности штаммов и повышению радиозащитной активности. Введение инактивированных  $\gamma$ -излучением культур микроорганизмов *E. coli* штаммов “КВ-1”, “ПЛ-6” через 3 сут после внешнего радиационного воздействия восстанавливало гематологические, биохимические и иммунные показатели, что способствовало сохранению от 66.7 до 83.3% облученных лабораторных животных (белых мышей и белых крыс) в ЛД<sub>83,3–100</sub>, что дает основание для его дальнейшего использования как средства терапии острой лучевой болезни.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) (The work was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership

Program of Kazan (Volga Region) Federal University (PRIORITY-2030)).

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи (The authors declare no conflicts of interests).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ” для выполнения научно-исследовательской работы, государственная регистрация № 01200202604 (The work was carried out at the expense of the funds of the subsidy allocated by the Federal State Budgetary Institution “FCTRБ-VNIVI” for the performance of research work, state registration No. 01200202604).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайнутдинов Т.Р., Вагин К.Н., Рыжкин С.А. Способ лечения радиационно-термических ожогов. *Радиация и риск*. 2023;32(1):108–117. [Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Ryzhkin S.A. Method of treatment of radiation-thermal burns. *Radiation and risk*. 2023;32(1):108–117 (In Russ.)] <http://doi.org/10.21870/0131-3878-2023-32-1-108-117>
2. Islam M.T. Radiation interactions with biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.* 2017;93(5):487–493. <http://doi.org/10.1080/09553002.2017.1286050>
3. Воронцова З.А., Зюзина В.В. Иммунные эффекты на воздействие малых доз — облучения в эксперименте. Материалы конференции. Фундаментальные и прикладные исследования в медицине. Франция, Париж, 15–22 октября 2011 г. 2011;11:80–81. [Vorontsova Z.A., Zyuzina V.V. Immune effects on the effect of small doses of radiation in an experiment. Conference proceedings. Fundamental and applied research in medicine. France, Paris, October 15–22, 2011. 2011;11:80–81 (In Russ.)]
4. Аклеев А.А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2020;65(4):29–35. [Akleev A.A. Human immune status in the long-term period of chronic radiation exposure. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(4):29–35. (In Russ.)]. <http://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35>
5. Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M. et al. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa riverside residents <sup>137</sup>Cs. *Health Phys.* 2013;104(5):481–498. <http://doi.org/10.1097/HP.0b013e318285bb7a>
6. Слюсарева О.А., Воронцова З.А. Доза–эффекты однократного облучения и состояние гомеостаза слизистой оболочки тощей кишки в динамике пролонгированности сроков наблюдения. *Вестн. новых мед. технологий*. 2010;17(2):39–41. [Slyusareva O.A., Vorontsova Z.A. Dose–effects of single–dose irradiation and the state of homeostasis of the jejunum mucosa in the dynamics of prolonged follow-up periods. *Bull. New Med. Technols.* 2010;17(2):39–41. (In Russ.)]

7. Засухина Г.Д. Адаптивный ответ — общебиологическая закономерность: факты, гипотезы, вопросы. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008;48(4):464–473. [Zasukhina G.D. Adaptive Response — the General Biological Tendency: Facts, Hypothesis, Questions. *Radiation Biology. Radioecology*. 2008;48(4):464–473 (In Russ.)]
8. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток. *Экол. генетика*. 2006; 4(3):7–19. [Ingel F.I. Perspectives of micronuclear test in human lymphocytes cultivated in cytogenetic block conditions. Part 1: cell proliferation. *Ecological genetics*. 2006;4(3):7–19. (In Russ.)].
9. Kuruba V., Gollapalli, P. Natural radioprotectors and their impact on cancer drug discovery. *Radia. Oncol. J.* 2018;36(4):265–275.  
<http://doi.org/10.3857/roj.2018.00381>
10. Smith T.A., Kirkpatrick D.R., Smith S. et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *J. Translat. Med.* 2017;15(1):232.  
<http://doi.org/10.1186/s12967-017-1338-x>.
11. Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Nizamov R.N. et al. Radioprotective activity of gamma-irradiated *St. aureus* variants. *Linguistica Antverpiensia*. 2021;2:1176–1193.
12. Bin Qiu, Abudureyimujiang Aili, Lixiang Xue, et al. Advances in Radiobiology of Stereotactic Ablative Radiotherapy. *Front. Oncol.* 2020;10:1165.  
<http://doi.org/10.3389/fonc.2020.01165>
13. Leblanc J., Burt J. Radiation Biology and Its Role in the Canadian Radiation Protection Framework. *Health Physics*. 2019;3(117):319–329.  
<http://doi.org/10.1097/HP.0000000000001060>
14. Smolen J.S., Aletaha D., Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nature Rev. Rheumatol.* 2012;8:235–243.  
<http://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.23>
15. Yarilina, A. Kai Xu, Chunhin Chan, Lionel B Ivashkiv. Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor-activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by JAK inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2012;64(12):3856–3866.  
<http://doi.org/10.1002/art.37691>
16. Гайнутдинов Т.Р. Оценка противорадиационной эффективности препаратов, полученных на основе веществ микробного происхождения. *Vet. врач.* 2024;1:52–57. [Gaynutdinov T.R. Evaluation of the anti-radiation effectiveness of drugs derived from substances of microbial origin. *Veterinarian*. 2024;1:52–57. (In Russ.)].  
[http://doi.org/10.33632/1998-698X\\_2024\\_1\\_52](http://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_1_52)
17. Симбирцев А.С., Кетлинский С.А. Перспективы использования цитокинов и индукторов синтеза цитокинов в качестве радиозащитных препаратов. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019;59(2):170–176. [Simbirtsev A.S., Ketlinsky S.A. Prospects for the use of cytokines and cytokine synthesis inducers as radioprotective drugs. *Radiation Biology. Radioecology*. 2019;59(2):170–176. (In Russ.)].  
<http://doi.org/10.1134/S0869803119020164>
18. Vagin K.N., Gaynutdinov T.R., Nizamov R.N. et al. Obtaining and application of a radioprotective preparation of microbial origin. *Linguistica Antverpiensia*. 2021;2:1156–1175.
19. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы бактериологического контроля стерильности: межгосударственный стандарт Российской Федерации: издание официальное. Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П): введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 319-ст: введен взамен ГОСТ 28085-89: дата введения 2014-07-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов” (ФГБУ “ВГНКИ”). Техэксперт: офиц. сайт. — URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200104835> (дата обращения: 30.09.2022). [GOST 28085-2013. Biological medicinal products for veterinary use. Methods of bacteriological sterility control: Interstate Standard of the Russian Federation: official publication: adopted by the Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Protocol No. 55-P of March 25, 2013): put into effect by order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of June 28, 2013. No. 319-st: introduced instead of GOST 28085-89: date of introduction 2014-07-01 / developed by the Federal State Budgetary Institution “All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines and Feed” (FGBI “VGNKI”). Techexpert: ofic. website. — URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200104835> (accessed: 30.09.2022). (In Russ.)]
20. ГОСТ 31926-2013. Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности: межгосударственный стандарт Российской Федерации: издание официальное: принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол 7 мая 2013 г. № 43): введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 243-ст: введен впервые: дата введения 2014-07-01 / подготовлен Федеральным государственным бюджетным учреждением “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов” (ФГБУ “ВГНКИ”). Техэксперт: офиц. сайт. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200103451> (дата обращения: 30.09.2022). [GOST 31926-2013. Medicinal products for veterinary use. Methods for determining harmlessness: Interstate Standard of the Russian Federation: official publication: adopted by the Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Protocol No. 43 of May 07, 2013): put into effect by order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of June 27, 2013. No. 243-st: introduced for the first time: date of introduction 2014-07-01 / prepared by the Federal State Budgetary Institution “All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines and Feed” (FGBI “VGNKI”). Techexpert: ofic. website. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200103451> (accessed: 30.09.2022). (In Russ.)]
21. Авилов В.М., Равилов А.З., Киршин В.А. и др. Патент № 2169572 С2 Российская Федерация, МПК

- А61К 35/28, 35/78. Способ лечения радиационных поражений организма и способ получения препарата для лечения радиационных поражений организма. № 97113199/14, заявл. 31.07.1997, опубл. 27.06.2001. 7 с. [Avilov V.M., Ravilov A.Z., Kirshin V.A. et al. Patent No. 2169572 C2 Russian Federation, IPC А61К 35/28, 35/78. A method for the treatment of radiation damage to the body and a method for obtaining a drug for the treatment of radiation damage to the body. No 97113199/14, declared on 31.07.1997, publ. 27.06.2001. 7 p. (In Russ.)]
22. Фримель Г. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля; Перевод с немецкого А.П. Тарасова. М.: Медицина, 1987. 472 с. [Frimel G. Immunological methods / Ed. G. Frimel; Translated from the German by A.P. Tarasov. M.: Publishing House of Medicine. 1987. 472 p. (In Russ.)]
  23. Гончаренко М.С., Латинава А.М. Метод перекисного окисления липидов. *Лаб. дело*. 1985;1:60–61. [Goncharenko M.S., Latinova A.M. Method of lipid peroxidation. *Laboratory business*. 1985;1:60–61. (In Russ.)]
  24. Гурьянова В.А., Трошин Е.И. Изучение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях крыс при облучении: Материалы республиканской научно-производственной конференции: “Актуальность проблемы ветеринарии и зоотехнии”. Казань, 1996. С. 97. [Guryanova V.A., Troshin E.I. Studying the level of lipid peroxidation (POL) in rat tissues under irradiation: Materials of the Republican scientific and industrial conference: “Relevance of the problem of veterinary medicine and animal science”. Kazan, 1996. P. 97. (In Russ.)]
  25. Гайнутдинов Т.Р., Идрисов А.М., Фролов А.В. и др. Определение радиозащитной эффективности инактивированных  $\gamma$ -облучением штаммов микроорганизмов. *Vet. врач*. 2022;2:13–20. [Gaynutdinov T.R., Idrisov A.M., Frolov A.V. et al. Determination of the radioprotective effectiveness of inactivated gamma-irradiated strains of microorganisms. *Veterinarian*. 2022;2:13–20. (In Russ.)]. [http://doi.org/10.33632/1998-698X.2022\\_13\\_20](http://doi.org/10.33632/1998-698X.2022_13_20)
  26. Reisz J.A., Bansal N., Qian J. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(2):260–292. <http://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>
  27. Raviraj J., Bokkasam V.K., Kumar V.S., Reddy U.S., Suman V. Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. *Ind. J. Dental Res.* 2014;25(1): 83–90. <http://doi.org/10.4103/0970-9290.131142>
  28. Kumar Raj, Singh Shrahan Kumar. Exploitation of microbial resources for radioprotector development: current status at Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences. *J. Radiat. Cancer Res.* 2016;7(1):38.
  29. Wang, W., Xue C., Mao X. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;153:373–384. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203>
  30. Shuryak I., Matrosova V.Y., Gaidamakova E.K. et al. Microbial cells can cooperate to resist high-level chronic ionizing radiation. *PloS One*. 2017;12(12):e0189261. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189261>

## Development of a Therapeutic Agent Based on *Escherichia coli*, Assessment of Harmlessness and Anti-Radiation Activity

T. R. Gaynutdinov<sup>1,2\*</sup>, K. N. Vagin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Center for Toxicological,  
Radiation and Biological Safety”, Kazan, Russia

<sup>2</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia

\*E-mail: [gtr\\_timur@mail.ru](mailto:gtr_timur@mail.ru)

The paper presents the development, assessment of the safety and antiradiation activity of a therapeutic agent based on the culture of *Escherichia coli* strains “PL-6” and “KV-1”. To obtain the antiradiation agent, the causative agent of colibacillosis was grown in meat-peptone broth in a thermostat at a temperature of 37°C for 3 days. The grown suspension was centrifuged at 3000 rpm for 50 min, the supernatant was decanted. The sediment was brought to 1 billion cm<sup>3</sup> with distilled water. Smears were prepared from the grown cultures and stained according to Gram to determine the purity and species of the grown culture. The prepared suspension was poured into sterile vials of 10, 50 or 100 cm<sup>3</sup>, sealed with rubber stoppers and rolled with aluminum caps, labeling with an indication of the strain, radiation dose and date. Irradiation of the microbial material was carried out on the  $\gamma$ -installation “Issledovatel”, source <sup>60</sup>Co, absorbed dose rate of 1.028 Gy/sec, in the ranges of absorbed doses from 7.5 to 30.0 kGy with interdose intervals of 2.5 and 5.0 kGy. The degree of inactivation of  $\gamma$ -irradiated *E. coli* cultures was determined by seeding them on meat-peptone agar and thermostating for 168 hours, recording the presence or absence of microorganism growth. The studies have established that the timing and degree of growth of irradiated *E. coli* cultures of the “PL-6” and “KV-1” strains are directly dependent on the radiation dose, their complete inactivation occurs with irradiation at a dose of 25.0 kGy. Further studies have shown that the developed biopreparation obtained on the basis of *E. coli* is sterile, areactogenic, non-toxic and harmless. The mechanism of formation of radioresistance of the organism against the background of application of antiradiation agents based on *E. coli* strains “PL-6” and “KV-1” consisted in restoration of hematological, biochemical and immune parameters, which contributed to preservation of 66.7 to 83.3% of lethally irradiated animals.

**Keywords:** microorganism, white mice, rats, irradiation, acute radiation sickness, biopreparation, therapy, efficiency, body resistance

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гайнутдинов Тимур Рафкатович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ “Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности” (ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”), Казань, Россия; ст. науч. сотр. ФГАОУВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” (ФГАОУВО «КФУ»), Казань, Россия. gtr\_timur@mail.ru; +7 (950) 948-54-09 <https://orcid.org/0000-0003-3832-883X>

Вагин Константин Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб., вед. науч. сотр. ФГБНУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”, Казань, Россия; ст. науч. сотр. ФГАОУВО “КФУ”, Казань, Россия. kostya9938@yandex.ru; +7 (927) 433-33-55 <https://orcid.org/0000-0003-4396-614X>

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gaynutdinov Timur Rafkatovich, PhD. Biol. nauk, ved. nauk. sotr. Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological

Safety” (FSBSI “FCTRBS-ARRVI”), Kazan, Russia; art. scientific. sotr. Kazan Federal University (KFU), Kazan, Russia; gtr\_timur@mail.ru; +7 (950) 948-54-09 <https://orcid.org/0000-0003-3832-883X>

Vagin Konstantin Nikolaevich, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Ved. sci. FSBSI “FCTRBS-ARRVI”, Kazan, Russia; art. scientific. sotr. KFU, Kazan, Russia; kostya9938@yandex.ru; 8927433-33-55; <https://orcid.org/0000-0003-4396-614X>

**Вклад авторов:** Т.Р. Гайнутдинов — проведен литературный обзор по теме статьи, выполнена экспериментальная часть работы, обработан полученный материал, отредактирован текст, подготовлена рукопись; К.Н. Вагин — научное редактирование текста.

**Authors contribution:** TR. Gaynutdinov — a literary review on the topic of the article was conducted, the experimental part of the work was performed, the received material was processed, the text was edited, the manuscript was prepared; K.N. Vagin — scientific text editing.

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]:616-03:613.648:539.163:539.1.047

**ХАРАКТЕРИСТИКА КОГОРТЫ ПЕРСОНАЛА СУБЛИМАТНОГО  
ПРОИЗВОДСТВА СИБИРСКОГО ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА,  
ЗАДЕЙСТВОВАННОГО В РАБОТЕ С ПЛУТОНИЕМ-239**

© 2024 г. Д. Е. Калинин<sup>1,2\*</sup>, Г. В. Горина<sup>1</sup>, О. В. Литвинова<sup>1</sup>,  
И. В. Мильто<sup>1,2</sup>, А. Р. Тахауов<sup>1</sup>, Л. Р. Тахауова<sup>1,2</sup>, Ю. А. Самойлова<sup>3</sup>, А. Б. Тривоженко<sup>3</sup>,  
В. А. Авхименко<sup>3</sup>, Р. М. Тахауов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Северский биофизический научный центр  
Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия  
<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия  
<sup>3</sup>Сибирский федеральный научно-клинический центр  
Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия  
\*E-mail: kalinkin750@gmail.com, mail@sbrsc.seversk.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2023 г.

Плутоний-239 обладает свойством инициировать радиогенные заболевания у работников, контактирующих с ним в процессе профессиональной деятельности. Для исследования неблагоприятных медико-биологических эффектов и детального изучения потенциальных последствий воздействия плутония на организм персонала объектов использования атомной энергии необходимо сформировать когорту лиц, задействованных в работе с этим изотопом. Цель исследования — сформировать и охарактеризовать когорту персонала сублиматного производства Сибирского химического комбината, задействованного в работе с плутонием-239 в период 1953–2000 гг.

Источником информации для формирования когорты служила база данных регионального медико-дозиметрического регистра населения ЗАТО Северск и персонала Сибирского химического комбината, содержащая персональную, дозиметрическую и медико-биологическую информацию относительно всех действующих и бывших работников Сибирского химического комбината (около 65 000 человек) с момента основания предприятия по настоящее время.

В рамках настоящей работы сформирована когорта персонала сублиматного производства, задействованного в работе с плутонием-239 в период 1953–2000 гг., численность которой составляет 1052 человека (577 мужчин и 475 женщин). Дана дозиметрическая и медико-биологическая характеристика работников, включенных в когорту сублиматного производства. Созданная когорта сублиматного производства позволит проводить комплексные ретроспективные и проспективные эпидемиологические исследования по оценке заболеваемости и смертности персонала объектов использования атомной энергии, а также делать научно обоснованные выводы относительно роли плутония-239 в инициации важнейших социально значимых неинфекционных заболеваний (например, злокачественных новообразований, болезней системы кровообращения и др.) и смертности от них. Научные данные, полученные в результате настоящего исследования, позволят определить основные направления по организации системы оценки рисков для здоровья персонала на участках по выводу из эксплуатации объектов использования атомной энергии и формированию комплекса мероприятий, направленных на совершенствование системы здоровьесбережения работников объектов использования атомной энергии и продление их трудового долголетия.

**Ключевые слова:** плутоний-239, персонал сублиматного производства

**DOI:** 10.31857/S0869803124020065, **EDN:** NBESRN

Плутоний — химический элемент, являющийся важнейшим продуктом производственного цикла предприятий атомной отрасли. Однако, учитывая широкое его использование и одно из главных свойств — радиоактивность, <sup>239</sup>Pu служит предметом постоянного научного интереса в отношении его

способности вызывать развитие злокачественных новообразований (ЗНО) у работников, прямо или опосредованно с ним контактирующих [1, 2].

В решении задач индивидуального дозиметрического контроля (ИДК) внутреннего облучения от <sup>239</sup>Pu работников, имеющих производственный

контакт с данным радионуклидом, наиболее эффективным является метод косвенной дозиметрии, основанный на определении содержания этого радионуклида в моче и последующей интерпретации полученных результатов. В связи с чрезвычайно малой скоростью выведения  $^{239}\text{Pu}$  из организма с мочой его активность в анализируемых пробах оказывается, как правило, весьма низкой даже при значительных количествах инкорпорированного радионуклида в организме. Это обстоятельство требует наличия достаточно малого значения нижнего предела диапазона измерений (НПДИ), которое должен иметь метод, предназначенный для определения  $^{239}\text{Pu}$  в моче при косвенно-дозиметрическом контроле внутреннего облучения. Для ИДК внутреннего облучения от  $^{239}\text{Pu}$  персонала объектов использования атомной энергии (ОИАЭ) применяются радиометрические методы определения  $^{239}\text{Pu}$  в моче, имеющие значение НПДИ на уровне 10–15 мБк в суточном количестве мочи [1, 3, 4].

Ингаляционный путь является основным путем поступления  $^{239}\text{Pu}$  в организм работников ОИАЭ. При косвенно-дозиметрическом контроле внутреннего облучения для корректного перевода измеренных значений активности  $^{239}\text{Pu}$  в моче в дозу внутреннего облучения, наряду со знанием физико-химических характеристик поступающих аэрозолей и параметров биологических процессов обмена поступившего в организм радионуклида, требуется информация о динамике его поступления [2, 5–8].

В большинстве исследований, посвященных изучению повреждения ДНК у работников ОИАЭ, наблюдается значительно более высокий уровень ее повреждения по сравнению с группами, не подвергавшимися в процессе трудовой деятельности воздействию ионизирующего излучения (ИИ) [9]. Радиационно-индуцированные ЗНО возникают при мутациях в соматических клетках, вызванных воздействием ИИ. Так, повышение риска возникновения радиогенных ЗНО кроветворных тканей (например, лейкозов) наблюдается в течение 2–5 лет воздействия ИИ, радиогенных солидных ЗНО, как правило, — составляет не менее 5–10 лет [6, 7].

Таким образом, несмотря на значительные успехи по изучению механизмов негативного влияния  $^{239}\text{Pu}$  на организм человека, требуется продолжение исследований, направленных на изучение роли плутония в развитии ЗНО у работников ОИАЭ, с ним контактирующих. Для выполнения подобных исследований необходимо сформировать когорту лиц, занятых в работах с  $^{239}\text{Pu}$ .

Означенная когорта должна быть составлена из работников крупного ОИАЭ, на котором осуществляются работы с  $^{239}\text{Pu}$ . На ОИАЭ должны отсутствовать аварийные ситуации, приводящие к сверхнормативному облучению персонала. Данному требованию соответствует Сибирский химический комбинат (СХК) — один из крупнейших в мире ОИАЭ.

Персонал СХК трудится на предприятиях основного производства — реакторном (РП), радиохимическом (РХП), разделительном (РдП), сублиматном (СП), плутониевом (ПП) и вспомогательного производства СХК. Работники основных производств составляют 52.6% всего персонала СХК. Соотношение мужчин и женщин на основном и вспомогательном производствах составляет 3.9 : 1 и 2.2 : 1 соответственно.

На различных производствах СХК удельный вес работников, контролируемых по внешнему облучению ( $\gamma$ -излучение), различается с учетом специфики производственного процесса, а также используемых технологий и оборудования. На РП и РХП более 70% работников имеют данные ИДК, в то время как на ПП и РдП доля работников, состоящих на ИДК, составляет около 41%.

подавляющее большинство работников, подвергавшихся воздействию внешнего облучения ( $\gamma$ -излучение), имеют среднюю дозу внешнего облучения (СДВО) в пределах от 0 до 200 мЗв.

Формирование и подробная дозиметрическая характеристика когорты СП позволяют более корректно рассчитывать индивидуальные дозы внутреннего облучения работников СХК, более адекватно проводить оценку эффектов радиационного воздействия и использовать полученные данные при формировании групп персонала для проведения соответствующих профилактических, лечебно-диагностических и реабилитационных мероприятий.

Цель исследования — сформировать и охарактеризовать когорту персонала СП СХК, задействованного в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Источником информации служил региональный медико-дозиметрический регистр населения ЗАТО Северск и персонала СХК (РМДР) Северского биофизического научного центра, содержащий персональную, дозиметрическую и медико-биологическую информацию относительно работников СХК.

РМДР представляет собой постоянно действующую и пополняемую систему сбора, систематизации персонафицированной информации и научного анализа данных, вследствие чего является эффективным инструментом для реализации эпидемиологических подходов к оценке эффектов воздействия ИИ.

В базе данных РМДР содержится информация относительно всех действующих и бывших работников СХК (около 65 000 человек) с момента основания СХК по настоящее время: персональные данные, сведения о характере профессиональной деятельности, виде профессионального облучения, методах измерения и динамике накопления индивидуальных доз внешнего облучения, содержании различных радионуклидов в организме, причинах смерти, наиболее значимых заболеваниях, вредных привычках и др.

Основным источником информации о работниках служили индивидуальные карточки (ф. Т-2) сектора учета отдела кадров СХК, содержащие сведения о дате рождения и трудоустройства, месте работы, профессии, переводе с одного предприятия на другое. Данные об индивидуальных дозах внешнего  $\gamma$ -излучения, измеренных с помощью фотопленочных и термолюминесцентных дозиметров, были получены в отделе охраны труда, ядерной и радиационной безопасности СХК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Число работников СП СХК в период 1953–2000 гг. составляет 4220 человек (3226 мужчин и 994 женщины) (табл. 1).

ИДК внешнего облучения выполнен у 1733 работников (1451 мужчина и 282 женщины). Средняя СДВО, накопленная работниками СП СХК в течение изучаемого периода, составила  $11.93 \pm 18.36$  мЗв (среди мужчин —  $12.89 \pm 19.88$  мЗв, среди женщин —  $9.02 \pm 12.38$  мЗв).

Данные о количественном распределении работников СП в зависимости от СДВО представлены

**Таблица 2.** Распределение работников сублиматного производства СХК в зависимости от суммарной дозы внешнего облучения

**Table 2.** Distribution of SCP sublimation production employees, depending on the total dose of external irradiation

Распределение по полу	СДВО, мЗв					
	0	(0–100]	(100–200]	(200–500]	(500–1000]	>1000
Мужчины	31	954	211	180	71	4
Женщины	3	222	39	17	1	0
Всего	34	1176	250	197	72	4

**Таблица 1.** Число работников сублиматного производства СХК (1953–2000 гг.)

**Table 1.** Number of SCP sublimation production employees (1953–2000)

Распределение по полу	Общее число работников
Мужчины	3226
Женщины	994
Всего	4220

**Таблица 3.** Число работников сублиматного производства СХК, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг.

**Table 3.** Number of SCP sublimation production employees involved in working with  $^{239}\text{Pu}$  in 1953–2000

Распределение по полу	Число работников
Мужчины	577
Женщины	475
Всего	1052

в табл. 2, из которой следует, что основная доля работников СП имеют СДВО в диапазоне 0–100 мЗв (67.86% от всех лиц когорты СП с зарегистрированными дозами внешнего облучения).

В табл. 3 представлено число работников СП, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг.

Как указано в табл. 3, в период 1953–2000 гг. в работе с  $^{239}\text{Pu}$  на СП было задействовано 1052 работника СП (577 мужчин и 475 женщин).

Далее представлены сведения относительно результатов ИДК внешнего и внутреннего облучения у работников СП СХК, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг.

ИДК внешнего облучения выполнен у 465 работников СП СХК: 391 мужчины и 74 женщин (табл. 4). Как указано в табл. 4, 51.82% работников, входящих в когорту СП, имеют СДВО в диапазоне 0–100 мЗв.

**Таблица 4.** Распределение работников сублиматного производства СХК, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг., в зависимости от суммарной дозы внешнего облучения**Table 4.** Distribution of SCP sublimation production employees involved in working with  $^{239}\text{Pu}$  in 1953–2000, depending on the total dose of external irradiation

Распределение по полу	СДВО, мЗв					
	0	(0–10]	(10–20]	(20–50]	(50–100]	>100
Мужчины	2	39	29	59	62	200
Женщины	1	9	11	16	13	24
Всего	3	48	40	75	75	224

ИДК внутреннего облучения выполнен у 530 работников СП СХК: 433 мужчин и 74 женщин (табл. 5). Как указано в табл. 5, 94.34% работников, входящих в когорту СП, имеют содержание  $^{239}\text{Pu}$  в моче, не превышающую 0.74 Бк.

### ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени стало очевидно, что представления о закономерностях и механизмах действия ИИ в “малых” дозах (суммарная накопленная доза до 100 мЗв) весьма ограничены и неполны [4, 8]. Неопределенность спектра медико-биологических эффектов “малых” доз ИИ, а также сомнения относительно самой возможности реализации патологических изменений в результате данного воздействия свидетельствуют о целесообразности проведения исследований по установлению медико-биологических эффектов “малых” доз ИИ. При облучении ИИ человека традиционно рассматривается возможность проявления таких стохастических эффектов, как генетические нарушения и возникновение ЗНО [8–10].

В результате исследования из общего числа работников СП СХК в период 1953–2000 гг. (4220 человек, из них 3226 мужчин и 994 женщины) сформирована когорта СП — 1052 человека, из них 577 мужчин и 475 женщин, что составляет 85.9% работников СП СХК.

**Таблица 5.** Распределение работников сублиматного производства СХК, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг., в зависимости от содержания  $^{239}\text{Pu}$  в моче**Table 5.** Distribution of SCP sublimation production employees involved in working with  $^{239}\text{Pu}$  in 1953–2000, depending on the content of  $^{239}\text{Pu}$  in urine

Распределение по полу	Содержание $^{239}\text{Pu}$ в моче, Бк				
	≤0.046	(0.046–0.74]	(0.74–1.48]	(1.48–3.70]	>3.70
Мужчины	124	284	9	7	9
Женщины	40	52	3	–	2
Всего	164	336	12	7	11

В последние несколько десятилетий интенсивно изучается связь между повышенным риском развития неонкологических заболеваний при профессиональном техногенном облучении ИИ [11]. При этом остается множество неопределенностей относительно времени реализации и степени выраженности эффектов воздействия ИИ в диапазоне “малых” доз [12]. Эта информация является важной для понимания профессиональных рисков для более чем полумиллиона работников, занятых на различных ОИАЭ в мире [13, 14]. Для проведения научных исследований, отвечающих принципам доказательной медицины, необходимо на подготовительном этапе уделить внимание формированию репрезентативных когорт различных ОИАЭ.

В отсутствие прямых доказательств повышения риска развития неонкологических заболеваний у работников ОИАЭ различные международные организации рекомендовали для прогнозирования рисков применять линейную беспороговую модель, используя данные исследований когорты лиц, переживших атомную бомбардировку в Японии [15]. Линейная беспороговая модель предполагает линейность зависимости “доза–эффект” при “малых” дозах ИИ и предсказывает небольшие риски даже при самых низких уровнях облучения [16, 17].

Однако современные молекулярные и эпидемиологические исследования ставят под сомнение



корректность использования линейной беспороговой модели [18]. Таким образом, существует острая необходимость проведения прямых исследований работников, подвергавшихся профессиональному облучению ИИ, для получения наиболее обоснованных оценок рисков. Отдельные исследования работников, подвергавшихся профессиональному облучению в диапазоне “малых” доз ИИ, имеют низкую статистическую мощность для выявления рисков [19–20], поэтому представляется необходимым проведение крупных эпидемиологических исследований, объединяющих различные когорты работников ОИАЭ. Вследствие этого обстоятельства возрастают требования к когортам персонала различных ОИАЭ, которые должны иметь аналогичные параметры и подробно охарактеризованы.

Современный анализ когорт персонала ОИАЭ дает противоречивые результаты относительно повышенного риска развития неонкологических заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем при профессиональном техногенном внешнем облучении ( $\gamma$ -излучение) работников реакторных производств [21, 22]. В последние несколько лет получены важные доказательства относительно повышения рисков онкологических и неонкологических заболеваний при внешнем и внутреннем облучении, преимущественно от плутония [23, 24].

Целью формирования представленной когорты СП является создание информационной базы данных для изучения влияния  $^{239}\text{Pu}$  на состояние здоровья персонала, занятого в работе с ним.

Когорта сформирована на основании сведений базы данных РМДР, содержащего информацию относительно всех действующих и бывших работников СХК с момента основания предприятия по настоящее время.

Представленная когорта работников, является относительно небольшой по численности (1052 человека) в сравнении с когортами, сформированными в рамках исследований других авторов, посвященных изучению последствий воздействия  $^{239}\text{Pu}$  на здоровье работников ОИАЭ. Тем не менее данные сформированной когорты представляют собой базу данных, содержащую тщательно верифицированные сведения, необходимые для доказательной оценки влияния  $^{239}\text{Pu}$  на здоровье персонала, задействованного в работах с ним.

В частности, наиболее важными сведениями, необходимыми для выполнения научных исследований в означенном направлении, являются данные

относительно внешнего и внутреннего облучения работников, включенных в когорту СП.

Как было продемонстрировано выше, ИДК внешнего облучения выполнен у 44.2% работников СП, СДВО у 51.82% не превышала 100 мЗв.

ИДК внутреннего облучения выполнялся у 50.4% работников, у 93.34% активность  $^{239}\text{Pu}$  в моче не превышала 0.74 Бк.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформированная когорта работников СП СХК, задействованных в работе с  $^{239}\text{Pu}$  в период 1953–2000 гг., несмотря на относительно небольшой размер, может являться информационной основой для изучения неблагоприятного влияния означенного радионуклида на здоровье персонала, с ним контактирующего, и получения научных сведений, обладающих должной степенью доказательности.

Помимо этого, достоинством данной когорты является наличие полной дозиметрической и медико-биологической характеристики регистрантов, что позволяет объединить ее с аналогичными когортами других ОИАЭ при проведении широкомасштабных эпидемиологических исследований.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, тема НИР “Оценка радиационной обстановки и состояния здоровья персонала Сибирского химического комбината, задействованного в работе с соединениями урана”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Определение содержания плутония-239 и обогащенного урана в моче при их совместном присутствии. Аналитическая инструкция. Институт биофизики МЗ СССР. М., 1977. 13 с. [Determination of the content of plutonium-239 and enriched uranium in urine when they are present together. Analytical instructions. Institute of Biophysics, USSR Ministry of Health. M., 1977. 13 p. (In Russ.)].
2. Голутвина М.М., Садикова Н.М. Контроль за содержанием радиоактивных веществ в организме человека. М.: Атомиздат, 1979. 123 с. [Golutvina M.M., Sadikova N.M. Control over the content of radioactive substances in the human body. M.: Atomizdat, 1979. 123 p. (In Russ.)].
3. Хохряков В.Ф., Сулова К.Г., Романов С.А., Востротин В.В. Легочный клиренс промышленных соединений плутония в отдаленные сроки после начала ингаляции. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2000;45(2):28–34 [Khokhryakov V.F., Suslova K.G., Romanov S.A., Vostrotin V.V. Pulmonary clearance of industrial plutonium compounds in remote periods after the beginning of

- inhalation. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2000;45(2):28–34 (In Russ.).
4. Блинов А.П., Алпатов А.А., Горина Г.В. и др. Результаты исследования по выведению плутония из организма под воздействием пентацина при ингаляционном поступлении нуклида. *Вопросы радиационной безопасности*. 2020;2:55–65 [Blinov A.P., Alpatov A.A., Gorina G.V. et al. Analysis of pentacium-assisted plutonium excretion at inhalation intake of the radionuclide. *Radiation Safety Problems*. 2020;2:55–65 (In Russ.)].
  5. Tirmarche M., Apostoaei I., Blanchardon E. et al. ICRP Publication 150: Cancer Risks from Plutonium and Uranium Exposure. *Ann. ICRP*. 2021;50(4):141–143. <https://doi.org/10.1177/01466453211028020>
  6. Хохряков В.Ф., Суслова К.Г., Востротин В.В., Романов С.А. Адаптация модели легочного клиренса МКРЗ–66 к данным о кинетике обмена плутония у персонала “Маяка”. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2001;46(6):76–83 [Khokhryakov V.F., Suslova K.G., Vostrotin V.V., Romanov S.A. Adaptation of the ICRP–66 lung clearance model to data on plutonium metabolism kinetics in the ‘Mayak’ personnel. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2001;46(6):76–83 (In Russ.)].
  7. Khokhryakov V.F., Suslova K.G., Vostrotin V.V. et al. Adaptation of ICRP Publication 66. Respiratory tract model to data of plutonium biokinetics for Mayak workers. *Health Phys*. 2005;88(2):125–132. <https://doi.org/10.1097/01.hp.0000144575.37546.9d>
  8. Bess J.D., Krahenbuhe M.P., Miller S.C. et al. Uncertainties analysis for the plutonium dosimetry model, Doses–2005, using Mayak bioassay data. *Health Phys*. 2007;93 (3):207–219. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000266741.42070.e8>
  9. da Silva F.M.R. Júnior, Tavella R.A., Fernandes C.L.F., Dos Santos M. Genetic damage in coal and uranium miners. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En*. 2021;866:503348. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503348>
  10. Thandra K.C., Barsouk A., Saginala K. et al. Epidemiology of lung cancer. *Contemp. Oncol. (Pozn)*. 2021;25(1):45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
  11. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR): Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly with Scientific Annexes. Volume I. Annex B: Epidemiological evaluation of cardiovascular disease and other non-cancer diseases following radiation exposure. ed. New York: UNSCEAR, 2008.
  12. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR): Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2010 Report to the General Assembly with Scientific Report: Summary of Low-Dose Radiation Effects on Health. ed. New York: United Nations, 2013.
  13. Bouville A., Kryuchkov V. Increased occupational radiation doses: nuclear fuel cycle. *Health Phys*. 2014;106(2):259–271. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000066>
  14. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR): Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2008 Report to the General Assembly with Scientific Annexes. V. I. Annex B: Exposures of the Public and Workers from Various Sources of Radiation. ed. New York: UNSCEAR, 2010.
  15. National Research Council (NRC): Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation. BEIR VII Phase 2. Washington, DC: NRC, National Academies Press, 2006.
  16. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ionizing radiation, part 1: X-ray and gamma-radiation, and neutrons. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2000.
  17. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Internally Deposited Radionuclides. International Agency for Research on Cancer ed., vol. 78. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2001.
  18. Calabrese E.J., O’Connor M.K. Estimating risk of low radiation doses – a critical review of the BEIR VII report and its use of the linear no-threshold (LNT) hypothesis. *Radiat. Res*. 2014;182(5):463–474. <https://doi.org/10.1667/RR13829.1>
  19. Zablotska L.B., Ashmore J.P., Howe G.R. Analysis of mortality among Canadian nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res*. 2004;161(6):633–641. <https://doi.org/10.1667/rr3170>
  20. Howe G.R., Zablotska L.B., Fix J.J. et al. Analysis of the mortality experience amongst U.S. nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res*. 2004;162(5):517–526. <https://doi.org/10.1667/rr3258>
  21. Muirhead C.R., O’Hagan J.A., Haylock R.G. et al. Mortality and cancer incidence following occupational radiation exposure: third analysis of the National Registry for Radiation Workers. *Br. J. Cancer*. 2009;100(1):206–212. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604825>
  22. Gillies M., Richardson D.B., Cardis E. et al. Mortality from circulatory diseases and other non-cancer outcomes among nuclear workers in France, the United Kingdom and the United States. *Radiat. Res*. 2017;188(3):276–290. <https://doi.org/10.1667/RR14608.1>
  23. Hunter N., Kuznetsova I.S., Labutina E.V., Harrison J.D. Solid cancer incidence other than lung, liver and bone in Mayak workers: 1948–2004. *Br. J. Cancer*. 2013;109(7):1989–1996. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.543>
  24. Gillies M., Haylock R. The cancer mortality and incidence experience of workers at British Nuclear Fuels plc, 1946–2005. *J. Radiol. Prot*. 2014;34(3):595–623. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/34/3/595>

## Characteristics of the Cohort of Personnel of the Sublimate Production of the Siberian Chemical Plant Involved in Working with Plutonium-239

D. E. Kalinkin<sup>1,2,\*</sup>, G. V. Gorina<sup>1</sup>, O. V. Litvinova<sup>1</sup>, I. V. Milto<sup>1,2</sup>, A. R. Takhauov<sup>1</sup>,  
L. R. Takhauova<sup>1,2</sup>, Yu. A. Samoilo<sup>3</sup>, A. B. Trivozhenko<sup>3</sup>,  
V. A. Avkhimenko<sup>3</sup>, R. M. Takhauov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Seversk Biophysical Research Center  
of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russia

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup>Siberian Federal Scientific Clinical Center  
of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russia

\*E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, kalinkin750@gmail.com

<sup>239</sup>Pu has the property of initiating radiogenic diseases in workers who come into contact with it during their professional activities. To study adverse medical and biological effects and to study in detail the potential consequences of plutonium exposure on the body of personnel at nuclear energy facilities, it is necessary to form a cohort of people involved in working with this isotope. The purpose of the study is to form and characterize a cohort of Siberian Chemical Plant sublimation production employees involved in working with <sup>239</sup>Pu in the period 1953–2000. The source of information for forming the cohort was the database of the regional medical and dosimetric register of the population of closed administrative-territorial formation Seversk and the personnel of the Siberian Chemical Plant, containing personal, dosimetric, medical and biological information regarding all current and former employees of the Siberian Chemical Plant (about 65,000 people) since the founding of the enterprise till now. As part of this work, a cohort of sublimation production employees involved in working with <sup>239</sup>Pu in 1953–2000 was formed (1,052 people, 577 men and 475 women). The dosimetric, medical and biological characteristics of workers included in the sublimation production cohort are given. The created sublimation production cohort will make it possible to conduct comprehensive retrospective and prospective epidemiological studies to assess the morbidity and mortality of nuclear energy facilities employees, as well as to draw scientifically based conclusions regarding the role of <sup>239</sup>Pu in the initiation of the most important socially significant non-infectious diseases (for example, malignant neoplasms, diseases of the circulatory system etc.) and mortality from these diseases. The scientific data obtained as a result of this study will make it possible to determine the main directions for organizing a system for assessing risks to the health of personnel at sites for the decommissioning of nuclear facilities and the formation of a set of measures aimed at improving the health-saving system of nuclear facilities employees and extending their working longevity.

**Keywords:** <sup>239</sup>Pu, personnel of the sublimate production

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Калинкин Дмитрий Евгеньевич (Kalinkin Dmitry Evgenievich), kalinkin750@gmail.com,  
<https://orcid.org/0000-0002-6948-6075>

Горина Галина Викторовна (Gorina Galina Viktorovna), gorina.gal@mail.ru,  
<https://orcid.org/0009-0004-7019-6843>

Литвинова Олеся Владимировна (Litvinova Olesya Vladimirovna), litvinovaspironova@mail.ru,  
<https://orcid.org/0009-0003-5395-4297>

Мильто Иван Васильевич (Milto Ivan Vasilievich), milto\_bio@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

Тахауов Анас Равильевич (Takhauov Anas Ravilievich), Anas.t@inbox.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-8712-5815>

Тахауова Лилия Равильевна (Takhauova Liliya Ravilievna), tahaouvaa@gmail.com,  
<https://orcid.org/0000-0002-6261-9795>

Самойлова Юлия Александровна (Samoilova Yulia Alexandrovna), samoilovaua@med.tomsk.ru,  
<https://orcid.org/0009-0000-6407-7945>

Тривоженко Александр Борисович (Trivozhenko Alexandr Borisovich), borisah@yandex.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-6449-9523>;

Авхименко Виктор Александрович (Avkhimenko Viktor Aleksandrovich), kb81@med.tomsk.ru,  
<https://orcid.org/0000-0002-2178-601X>

Тахауов Равиль Манихович (Takhauov Ravil Manikho- vich), niirm2007@yandex.ru,  
<https://orcid.org/0000-0002-1994-957X>

**Вклад авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

The authors contributed equally to this article.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==  
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”  
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]:616-091:57.033:616.24.-004:613.648.4:539.1.047

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА  
У РАБОТНИКОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ  $\alpha$ -ОБЛУЧЕНИЮ**

© 2024 г. Г. В. Сычугов<sup>1</sup>, Т. В. Азизова<sup>2,\*</sup>, С. В. Осовец<sup>2</sup>, Е. Л. Казачков<sup>1</sup>,  
Е. С. Григорьева<sup>2</sup>, А. Г. Сычугов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

<sup>2</sup>Южно-уральский институт биофизики  
Федерального медико-биологического агентства, Озёрск, Россия  
\*E-mail: clinic@subi.su

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 03.02.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Цель настоящего исследования — поиск морфологических особенностей радиационно-индуцированного пневмофиброза при сравнении с легочным фиброзом другого генеза, используя биологические образцы ткани легкого работников, подвергшихся воздействию внутреннего  $\alpha$ -облучения. Морфологические характеристики пневмофиброза изучены на аутопсийных биологических образцах ткани легкого 56 работников с установленным при жизни диагнозом плутониевого пневмофиброза, 34 работников с пневмофиброзом другого генеза (в исходе хронических воспалительных заболеваний легких) и 35 работников без клинической легочной патологии (контроль). При этом суммарные поглощенные в легких дозы внешнего  $\gamma$ -излучения статистически значимо не различались между изучаемыми группами, а суммарные поглощенные в легких дозы внутреннего  $\alpha$ -излучения были значительно выше у работников с плутониевым пневмофиброзом. Для определения элементов внеклеточного матрикса были использованы моно- и поликлональные меченные антитела против коллагенов типов I, IV и V. Кроме того, для оценки системы регуляции метаболизма внеклеточного матрикса были использованы антитела против матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-9, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ TIMP-1, TIMP-2. В результате проведенного исследования обнаружены качественные и количественные морфологические особенности плутониевого пневмофиброза при сравнении с пневмофиброзом другого генеза, позволяющие заключить, что плутониевый пневмофиброз — это особый тип пневмофиброза, при котором отмечены особенности локализации и архитектоники очагов фиброза легочной ткани, нарушения содержания коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон легочной стромы. Анализ показал, что гиперпродукция коллагена типа V играет ключевую роль в развитии плутониевого пневмофиброза. Кроме этого, в развитии пневмофиброза важную роль играет нарушение баланса между экспрессией MMP и их ингибиторов.

**Ключевые слова:** профессиональное облучение,  $\alpha$ -излучение, легочный фиброз, внеклеточный матрикс, ПО “Маяк”

**DOI:** 10.31857/S0869803124020073, **EDN:** NBVCDMJ

Легочный фиброз, развивающийся у работников, подвергшихся профессиональному воздействию  $\alpha$ -активных аэрозолей трансураниевых элементов (ЛФР), рассматривается как детерминированный эффект (тканевая реакция) [1–5]. Первый случай ЛФР был зарегистрирован в когорте работников Производственного объединения (ПО) “Маяк” [6].

Регистр ЛФР, включающий 188 случаев, подробно описан Т.В. Азизовой и соавт. [5]. Показано, что частота ЛФР в когорте работников ПО “Маяк” значительно возрастает с увеличением суммарной поглощенной в легких дозы внутреннего  $\alpha$ -излучения

от инкорпорированного плутония-239, и не зависит от дозы внешнего  $\gamma$ -излучения. В работах, в которых представлены результаты исследований эффектов профессионального облучения у работников ПО “Маяк” [5, 7–11], авторы отмечают, что основными преимуществами этой когорты являются длительный период наблюдения, индивидуальные измеренные дозы внешнего и внутреннего облучения, полная медицинская информация за весь период наблюдения и наличие биопрепаратов различных органов и тканей, собранных у 30% членов когорты (в том числе 35.2% работников с установленным диагнозом

ЛФР), которые хранятся в Радиобиологическом репозитории тканей человека (РРТЧ) «Южно-Уральского института биофизики» Федерального медико-биологического агентства [12]. В последние десятилетия опубликовано много работ, посвященных когортным исследованиям работников ПО «Маяк». В этих работах представлены доказательства связи раковых и нераковых эффектов как с внешним  $\gamma$ -облучением, так и с внутренним  $\alpha$ -облучением [8–11, 13, 14]. Показаны статистически значимые зависимости не только для рака легкого, но и для хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) от суммарных поглощенных в легких доз внутреннего  $\alpha$ -облучения [8, 15, 16]. Однако механизмы радиационно-индуцированных эффектов остаются пока неясными. Целью настоящего исследования являлся поиск морфологических особенностей радиационно-индуцированного пневмофиброза при сравнении с легочным фиброзом другого генеза, используя биологические образцы ткани легкого работников, подвергшихся внутреннему альфа-облучению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для изучения морфологических особенностей ЛФР в РРТЧ на основе данных, содержащихся в медико-дозиметрической базе данных «Клиника» [7] идентифицированы биологические образцы ткани легкого (формалин-фиксированные парафиновые блоки (ФФПБ)) у 125 работников ПО «Маяк». Образцы были разделены на три группы: 1-ю группу составили 56 случаев с ЛФР, 2-ю группу — 34 случая с пневмофиброзом нелучевого генеза, в основном в исходе хронических воспалительных заболеваний легких (не-ЛФР); 3-ю группу — 35 случаев без легочной патологии (БЛП). Следует отметить, что все перечисленные диагнозы были установлены у работников при жизни и подтверждены после проведения аутопсийного исследования. ЛФР был диагностирован у работников, не имевших в анамнезе хронических заболеваний легких или сердца, на основании клинических симптомов и признаков, результатов физикального и рентгенологического обследований (простая рентгенография в двух проекциях и крупнофокусная рентгенография апикальной области и межреберье I–II), лабораторных исследований, исследования функции внешнего дыхания (жизненная емкость легких, мощность вдоха и выдоха, число дыхательных движений и число сердечных сокращений в минуту, диффузионная способность легких, сопротивление дыханию и др.).

Для классификации тяжести повреждения легочной паренхимы использовались критерии оценки легочного фиброза на основе шкалы Эшкрофта [17], модифицированной Хубнером [18]. Критерием включения в исследование принимался легочный фиброз 3-й степени и выше по шкале Ashcroft-Hubner. Для этой степени характерно умеренное утолщение альвеолярных или бронхиолярных стенок без явного повреждения легочной архитектоники.

Дополнительно к оценке степени выраженности легочного фиброза проводилось определение выраженности микроскопических признаков сопутствующих эмфизематозных изменений путем подсчета индекса респираторных бронхиол (ИРБ) [19]. Для этого измерялось соотношение между глубиной альвеол и поперечным сечением проводящего отдела бронхиол. Если  $Q$  — поперечное сечение респираторной бронхиолы вместе с альвеолами,  $X$  — ширина проводящего отдела, а  $Y$  — глубина альвеолы, то  $Q = X + 2Y$ . Отсюда ИРБ рассчитывался как

$$ИРБ = X / 2Y. \quad (1)$$

Основные характеристики изучаемых групп работников представлены в табл. 1.

Следует отметить, что суммарные поглощенные в легких дозы внешнего  $\gamma$ -излучения статистически значимо не различались между изучаемыми группами, а суммарные поглощенные в легких дозы внутреннего  $\alpha$ -излучения, были значительно выше у работников с ЛФР ( $p < 0.05$ ).

### *Гистологическая обработка материала*

Резецированные при аутопсии фрагменты легочной ткани фиксировали в 10%-ном нейтральном буферезированном формалине 24 ч, затем заливали в парафиновые блоки [20]. Из ФФПБ легких готовили срезы толщиной 5 мкм. Для обзорной микроскопии срезы легких окрашивали гематоксилином и эозином в соответствии со стандартным протоколом [21].

### *Определение соединительно-тканного каркаса легочной ткани*

Для определения соединительно-тканного каркаса легочной стромы и очагов пневмофиброза срезы окрашивали, используя следующие методы [21]: ван Гизона (выявление общего объема коллагеновых волокон); Гомори (выявление ретикулиновых волокон легочной стромы), Вейгерта (выявление эластических волокон легочной стромы). Для идентификации клеточных и

**Таблица 1.** Основные характеристики изучаемых групп работников**Table 1.** Main characteristics of the studied groups of workers

Характеристика	Группа 1 (ЛФР, $n = 56$ )	Группа 2 (не-ЛФР, $n = 34$ )	Группа 3 (БЛП, $n = 35$ )
Доля работников, нанятых до 1960 года, абс. (%)	56 (100.00%)	34 (100.00%)	35 (100.00)
Доля работников, когда-либо работавших на радиохимическом заводе, но никогда не работавших на плутониевом заводе, абс. (%)	4 (7.14%)	20 (58.83%)	25 (71.43)
Доля работников, когда-либо работавших на плутониевом заводе, абс. (%)	52 (92.86%)	6 (17.64%)	2 (5.71)
Доля лиц с измеренной $\alpha$ -активностью плутония в моче, абс. (%)	49 (87.50%)	33 (97.06%)	31 (88.57)
Возраст на момент смерти, лет	60.04 $\pm$ 9.20	63.50 $\pm$ 10.02	59.37 $\pm$ 6.23
Возраст на момент найма, лет Age at hire, years	27.25 $\pm$ 6.15	28.97 $\pm$ 6.67	25.74 $\pm$ 4.92
Продолжительность работы, лет	24.83 $\pm$ 7.56	24.73 $\pm$ 6.31	28.08 $\pm$ 7.08
Поглощенная в легком доза внешнего $\gamma$ -излучения, Гр	1.27 $\pm$ 0.62	1.49 $\pm$ 0.72	1.46 $\pm$ 0.70
Поглощенная в легком доза внутреннего $\alpha$ -излучения, Гр	5.13 $\pm$ 4.77	0.16 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.22

Примечание. ЛФР — легочный фиброз; БЛП — без легочной патологии; *Mean  $\pm$  St. Dev* обозначает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

стромальных гликопротеинов в структурах легких проводили ШИК-реакцию с постановкой контрольных реакций, использовали альциановый синий (при pH 2.5).

#### Иммуногистохимическое исследование

Во всех 125 случаях было проведено морфологическое изучение биологических образцов с применением метода иммуногистохимии (ИГХ).

Для определения элементов внеклеточного матрикса (ВКМ) были использованы моно- и поликлональные меченые антитела против коллагена I типа,

коллагена IV типа, коллагена V типа. Кроме того, для оценки системы регуляции метаболизма ВКМ были использованы антитела против матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-9, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ TIMP-1, TIMP-2. Список использованных клонов антител и их разведения приведены в табл. 2.

На первом этапе срезы депарафинировали по стандартной методике: в трех сменах о-ксилола по 10 мин; в трех сменах 95%-ного этанола по 5 мин; в двух сменах дистиллированной воды по 5 мин. После депарафинирования производили ингибирование

**Таблица 2.** Антитела, использованные для иммуногистохимического исследования**Table 2.** Antibodies used for the immunohistochemistry examination

Антитело	Клон	Рабочее разведение	Производитель	Каталожный номер
Collagen type I	N.A.	1:100	Abbotec, USA	251221
Collagen type IV	CIV22	1:100	Cell Marque, USA	239M-16
Collagen type V	N.A.	1:100	Abbotec, USA	251202
Cytokeratin Cocktail (AE1&AE3)	AE1&AE3	1:200	Cell Marque, USA	313M-16
MMP-2	N.A.	1:250	Epitomics, USA	1842-1
MMP-9	EP1254	1:250	Epitomics, USA	2551-1
TIMP-1	N.A.	1:500	Abbotec, USA	250883
TIMP-2	N.A.	1:500	Abbotec, USA	250884

Примечание: N.A. — недоступно или были использованы поликлональные антитела.

эндогенной пероксидазы с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода.

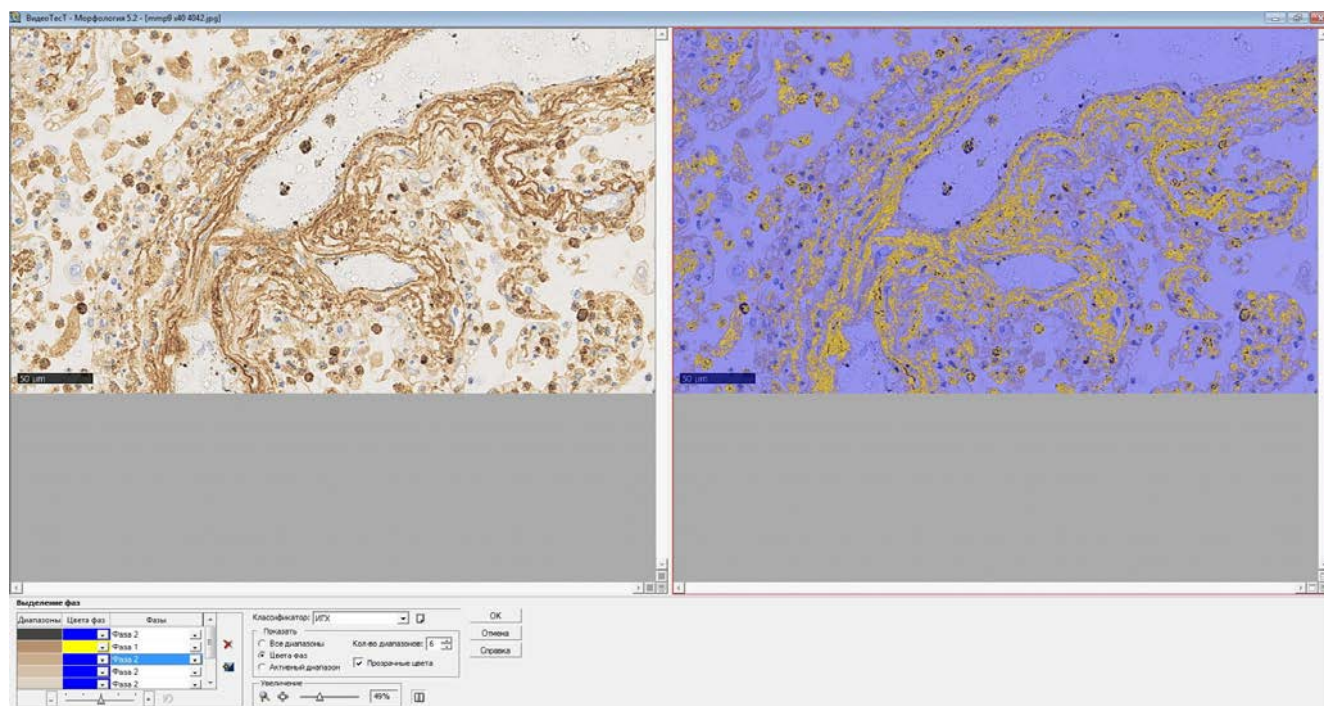
На втором этапе производили демаскировку антигенов путем кипячения предметных стекол с тканевыми срезами в цитратном буфере (pH — 6.0) и буфере ТРИС-ЭДТА (pH — 9.0) в течение 30 мин на водяной бане. Далее срезы охлаждали 30 мин при комнатной температуре и промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4). Для иммунного окрашивания использовали пероксидазный метод с полимерной системой детекции (Histofine® SimpleStain MAX PO MULTI, Япония). Срезы инкубировали с моно- и поликлональными антителами во влажной камере 60 мин при температуре 37°C. Во всех случаях проводили дополнительное окрашивание ядер гематоксилином Майера в течение 0.5–2 мин. Контрольные реакции выполняли без первичных специфических антител.

#### *Цифровая визуализация и количественная морфометрическая оценка*

Морфометрическое исследование проводилось в соответствии с методикой, описанной в предыдущих работах [22]. Все микропрепараты были

проанализированы двойным слепым методом. Количественная оценка результатов ИГХ была основана на микрофотографиях образцов легочной ткани, оцифрованных комплексной системой для микрофотографии, состоящей из микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40, цифровой камеры Jenoptik ProgRes CT3 (Jenoptik Group, Германия), персонального компьютера на базе Intel® Core™ i7, программного обеспечения ProgRes CapturePro 2.5. Захват изображения был выполнен с общим увеличением  $\times 200$  (10 для окуляра, 20 для объектива) и  $\times 400$  (10 для окуляра, 40 для объектива) при полностью закрытой апертурной диафрагме и приподнятом конденсоре. Время экспозиция составляло 4.11 мс, изображения сохранялись в виде jpeg-файлов с разрешением 1024 $\times$ 768 пикселей.

Изображения паренхимы легкого были отобраны случайным образом. Участки, содержащие дефекты тканей, дефекты окрашивания и артефакты, исключались. В каждом случае было захвачено не менее 10 полей изображений среза. Морфометрические оценки гистологических и ИГХ наблюдений были выполнены для каждого из 10 полей зрения с большим увеличением (площадь поля 0,25 мм<sup>2</sup>) [23].



**Рис. 1.** Использование псевдоцветных масок над изображениями, подчеркивающими экспрессию MMP-9 в эндотелии сосудов и волокнистых элементах легочной стромы, для количественного определения содержания металлопротеиназы в срезе легочной ткани.

**Fig. 1.** The use of pseudocolor masks above images highlighting MMP-9 expression in vessel endothelium and lung fiber components of the lung stroma for quantification of metalloproteinase content in a lung tissue section.

Таким образом, были обработаны образцы легочной ткани всех 125 доноров.

Анализ цифровых изображений использовался для количественной оценки морфологических изменений в ткани легкого. Количественное исследование проводили с помощью программы компьютерного анализа изображений “Морфология 5.1” (ВидеоТест, Россия). Окрашенные структуры (коллагеновые, ретикулярные и эластические волокна, а также продукты окрашивания ИГХ реакций) автоматически классифицировались программой на 10 каналов в зависимости от цвета и интенсивности окрашивания. После классификации на исследуемые структуры накладывались псевдоцветные маски (рис. 1) [22].

Относительную плотность изучаемых структур рассчитывали по отношению к общей площади исследуемого кадра ( $\text{мкм}^2/\text{мкм}^2$ ), аналогично ранее описанной в [24] методике, выраженную в объемных процентах (об. %).

#### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета прикладных программ “STATISTICA”. В расчетах использовали метод наименьших квадратов для определения параметров нелинейных моделей [25, 26]. Для аппроксимации эмпирических данных использовали модель Вейбулла [27].

Распределение положительных результатов окрашивания исследуемых элементов соединительного каркаса легочной стромы и очагов пневмофиброза, а также внеклеточного матрикса (в объемных процентах от общего объема образца, об. %) описывали с помощью функции распределения Вейбулла —  $F(x)$ :

$$F(x) = 1 - \exp \left[ - \ln 2 \left( \frac{X}{X_{50}} \right)^V \right], \quad (2)$$

здесь  $X$  — объемные проценты (об. %) для конкретного показателя,  $X_{50}$  — медианное значение этого показателя,  $V$  — параметр формы.

В настоящем исследовании, помимо функции распределения Вейбулла, как дополнительную количественную характеристику использовали плотность распределения —  $f(x)$ :

$$f(x) = \frac{V \ln 2}{X_{50}} \cdot \left( \frac{X}{X_{50}} \right)^{V-1} \cdot \exp \left[ - \ln 2 \left( \frac{X}{X_{50}} \right)^V \right], \quad (3)$$

которая является производной величиной  $f(x) = F'(x)$ .

Статистически значимыми считали различия при уровне  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Легочный фиброз развивается в межклеточном веществе. Межклеточное вещество состоит из аморфного основного вещества (несульфатированные и сульфатированные мукополисахариды) и волокон (коллагеновых, ретикулярных и эластических).

Исследование образцов 1-й группы показало, что очаги легочного фиброза наблюдались в большем количестве случаев в периферических (“плащевых”) отделах легочной ткани. При этом очаги поражения представляли обширные очаги, сливающиеся в поля, грубой фиброзной ткани. Между описанными зонами поражения определялись прослойки сохранившейся легочной респираторной ткани. В легочной ткани всех исследованных случаев 1-й группы определялся в разной степени выраженности реактивно воспалительный инфильтрат. При обзорной микроскопии в составе инфильтрата определялись лимфоциты, плазматические клетки, сегментоядерные нейтрофилы и гистиоциты.

Участки легочного фиброза в микропрепаратах 2-й группы располагались преимущественно в легочной ткани вокруг бронхов и сосудов. Сохранившаяся респираторная ткань в большинстве препаратов 2-й группы определялась в большем объеме по сравнению с препаратами 1-й группы, а гистоархитектоника легких 2-й группы была менее изменена. Склероз в образцах 2-й группы был преимущественно ретикулярным, в то время как склероз в образцах 1-й группы был крупноочаговым. Так же, как и в 1-й группе, во 2-й группе все образцы демонстрировали полиморфноклеточный воспалительный инфильтрат различной выраженности; состав воспалительного инфильтрата в препаратах обеих групп был сходным.

В микропрепаратах 3-й группы (контроль) очагов пневмосклероза не наблюдалось. В соединительнотканной строме легкого в 3-й группе преобладали ретикулярные волокна, а не коллагеновые, как в 1-й и 2-й группах. Ретикулярный каркас стромы легких в образцах 3-й группы практически не изменялся. Клеточная инфильтрация в образцах контрольной



группы наблюдалась очень редко и содержала отдельные лимфоцитарные и гистиоцитарные элементы.

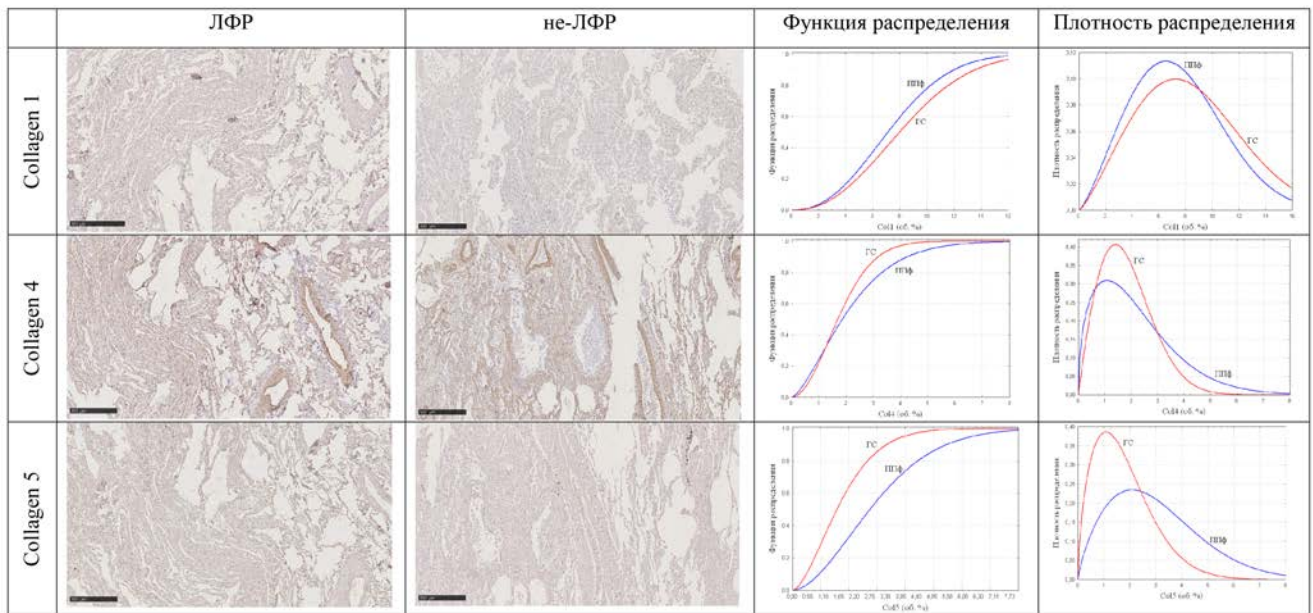
При анализе структурных компонентов соединительной ткани в препаратах обеих групп с фиброзом обнаружены статистически значимые различия почти всех исследованных показателей (за исключением экспрессии MMP-2). Общая выраженность легочного фиброза более всего определялась в микропрепаратах 1-й группы; общий объем пораженной фиброзом легочной ткани в препаратах 1-й группы был выше на 40% по сравнению с группой контроля. Выраженность сопутствующей эмфиземы по результатам измерения ИРБ наиболее представлена в группе не-ЛФР. Также в 1-й и 2-й группах выявлено снижение плотности ретикулярной стромы; однако количество ретикулярных волокон в образцах не-ЛФР было незначительно уменьшено.

Следует отметить, что повышенное содержание эластических волокон наблюдалось как в образцах ЛФР, так и в образцах не-ЛФР. Однако архитектура эластических волокон образцов была существенно изменена: эластические волокна деформировались, их толщина была неоднородной, и они

часто были утолщены. Тем не менее никаких отличительных особенностей не наблюдалось ни в структуре, ни в содержании ретикулярных/эластических волокон в образцах 1-й и 2-й групп.

Для различения соединительно-тканых и эпителиальных структурных элементов проводили ИГХ определение белков цитоскелета цитокератинов, содержащихся в клетках альвеолярного и бронхиального эпителия.

Коллагены типов I и V выявлялись преимущественно в стенках легочных сосудов, тогда как в очагах легочного фиброза преобладал коллаген типа IV (рис. 2). Уровень экспрессии коллагена типа I в образцах с фиброзом тканей исследуемых групп существенно не различался. То же самое наблюдалось для коллагена типа IV, в то время как уровень коллагена типа V был значительно выше в образцах ЛФР. В контрольной группе коллагены типов I и V обнаруживались только в стенках легочных сосудов, а коллаген типа IV можно было наблюдать в базальных мембранах альвеол и бронхиол. Статистически значимые различия между 1-й и 2-й группами обнаружены по коллагену типа V ( $p < 0.05$ ); его объем в легочной ткани был значительно больше в образцах ЛФР по сравнению с образцами не-ЛФР.



**Рис. 2.** Экспрессия коллагенов типов I, IV и V при ЛФР и не-ЛФР. Иммуногистохимический метод с антителами против Collagen type I, Collagen type IV, Collagen type V полимерная тест-система. Увеличение  $\times 50$ . Маркер 500  $\mu\text{m}$ . ЛФР и ППФ — радиационный легочный фиброз, не-ЛФР — нерадикационный легочный фиброз, ГС — группа сравнения (не-ЛФР).

**Fig. 2.** Expression of collagens type I, IV and V in LF and non-LF specimens. Immunohistochemistry with antibodies against Collagen type I, Collagen type IV, Collagen type V, polymer test-system. Magnification  $\times 50$ . Scale 500  $\mu\text{m}$ . LF and ППФ denotes plutonium-induced lung fibrosis, non-LF denote lung fibrosis of a different origin, GC denotes control (no pulmonary pathology).

Статистическое сравнение 1-й и 3-й групп выявило статистически значимые различия в общем количестве коллагена, эластических волокон, эпителиальных структур и коллагена типа V (табл. 3).

Экспрессия матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 выявлялась в клеточной цитоплазме, преимущественно в элементах воспалительного клеточного инфильтрата. Кроме этого, экспрессия металлопротеиназ в различной степени обнаруживалась в структурах ВКМ, в том числе в эндотелии сосудов и волокнистых элементах легочной стромы (рис. 3). При этом во 2-й группе содержание MMP-2 и TIMP-1 значительно пре-

обладало над содержанием соответствующих показателей 1-й группы (табл. 3).

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ TIMP-1 и TIMP-2 выявлялись в клеточной цитоплазме клеток воспалительного инфильтрата стромы, преимущественно макрофагов и нейтрофилов, а также в структурах ВКМ. Содержание ингибиторов металлопротеиназы TIMP-2 в образцах 1-й группы превалировало над образцами 2-й группы, содержание TIMP-1, напротив, показывало обратную картину (табл. 3).

Модель Вейбулла хорошо согласовывалась с эмпирическими данными (коэффициенты детерми-

**Таблица 3.** Описательные характеристики образцов легочной ткани (об%) изучаемых групп

**Table 3.** Descriptive characteristics of lung tissue specimens (Vol%) of the studied groups

Показатель, об%	Статистические характеристики								
	<i>n</i>	Mean	Med	Min	Max	LQ	UQ	Var	St.dev
Общий объем коллагеновых волокон	56	13.185**	12.234	2.284	30.532	8.446	17.106	41.834	6.468
	34	10.984	10.837	2.999	18.745	8.798	12.999	14.550	3.814
	35	9.529	8.626	3.195	20.663	6.259	11.422	16.609	4.075
Ретикулиновые волокна	56	8.791	7.960	1.124	22.729	5.142	10.957	22.435	4.737
	34	7.195	7.525	0.644	17.651	2.266	9.992	22.397	4.732
	35	9.311	9.061	1.115	16.404	5.585	12.196	15.918	3.989
Эластические волокна	56	8.623**	7.677	2.245	21.738	5.529	10.519	20.278	4.503
	34	7.207	7.305	2.689	13.049	5.387	8.194	7.676	2.771
	35	6.514	5.991	1.680	14.690	4.326	7.990	7.800	2.793
Эпителиальные структуры	56	4.363**	3.318	0.488	14.217	2.190	6.456	9.299	3.049
	34	4.039	3.678	0.959	9.167	2.549	4.890	4.108	2.027
	35	5.627	5.608	0.716	13.194	2.689	7.681	9.695	3.114
Collagen type I	56	2.160	2.058	0.204	6.616	0.927	3.026	2.065	1.437
	34	1.851	1.777	0.364	3.674	1.106	2.529	0.905	0.951
	35	7.428	7.184	1.666	13.703	4.804	10.344	9.755	3.123
Collagen type IV	56	7.511	7.309	1.015	17.319	4.691	9.789	12.142	3.484
	34	9.000	8.121	2.454	33.131	5.297	11.244	29.911	5.469
	35	2.485	1.856	0.117	7.123	1.294	3.926	3.252	1.803
Collagen type V	56	3.099***	2.600	0.594	7.624	1.780	4.319	3.055	1.748
	34	1.891	1.415	0.347	5.574	1.013	2.618	1.544	1.243
	35	2.235	1.775	0.084	6.367	0.888	3.522	2.531	1.591
MMP-2	56	0.999*	0.998	0.091	4.356	0.247	1.518	0.924	0.961
	34	2.473	1.413	0.156	9.088	0.527	3.403	6.585	2.566
	35	1.199	0.837	0.067	4.636	0.484	1.762	1.210	1.099
MMP-9	56	5.390	4.729	1.508	15.905	3.197	7.106	8.659	2.942
	34	5.097	4.171	0.573	13.934	3.304	6.545	9.545	3.089
	35	1.036	0.857	0.068	3.571	0.525	1.466	0.582	0.763
TIMP-1	56	0.770*	0.534	0.023	3.043	0.308	1.087	0.456	0.675
	34	1.390	0.872	0.217	8.080	0.599	1.526	2.279	1.510
	35	0.746	0.645	0.176	2.031	0.384	0.913	0.255	0.504
TIMP-2	56	1.217*	0.935	0.101	3.421	0.461	1.967	0.793	0.891
	34	0.668	0.568	0.110	2.149	0.402	0.817	0.190	0.436
	35	0.695	0.614	0.056	1.815	0.314	0.872	0.244	0.494
ИРБ	56	1.274*	1.255	0.460	2.580	1.015	1.545	0.156	0.395
	34	1.500	1.410	0.610	2.600	1.190	1.850	0.221	0.470
	35	1.077	1.090	0.750	1.390	1.000	1.190	0.027	0.164

Примечание. Изучаемые группы: 1-я группа ( $n = 56$ ), 2-я группа ( $n = 34$ ) и 3-я группа (контроль) ( $n = 35$ ).

\* Статистически значимое различие средних ( $p < 0.05$ ) между 1-й и 2-й группами; \*\* статистически значимое различие средних ( $p < 0.05$ ) между 1-й и 3-й группами.

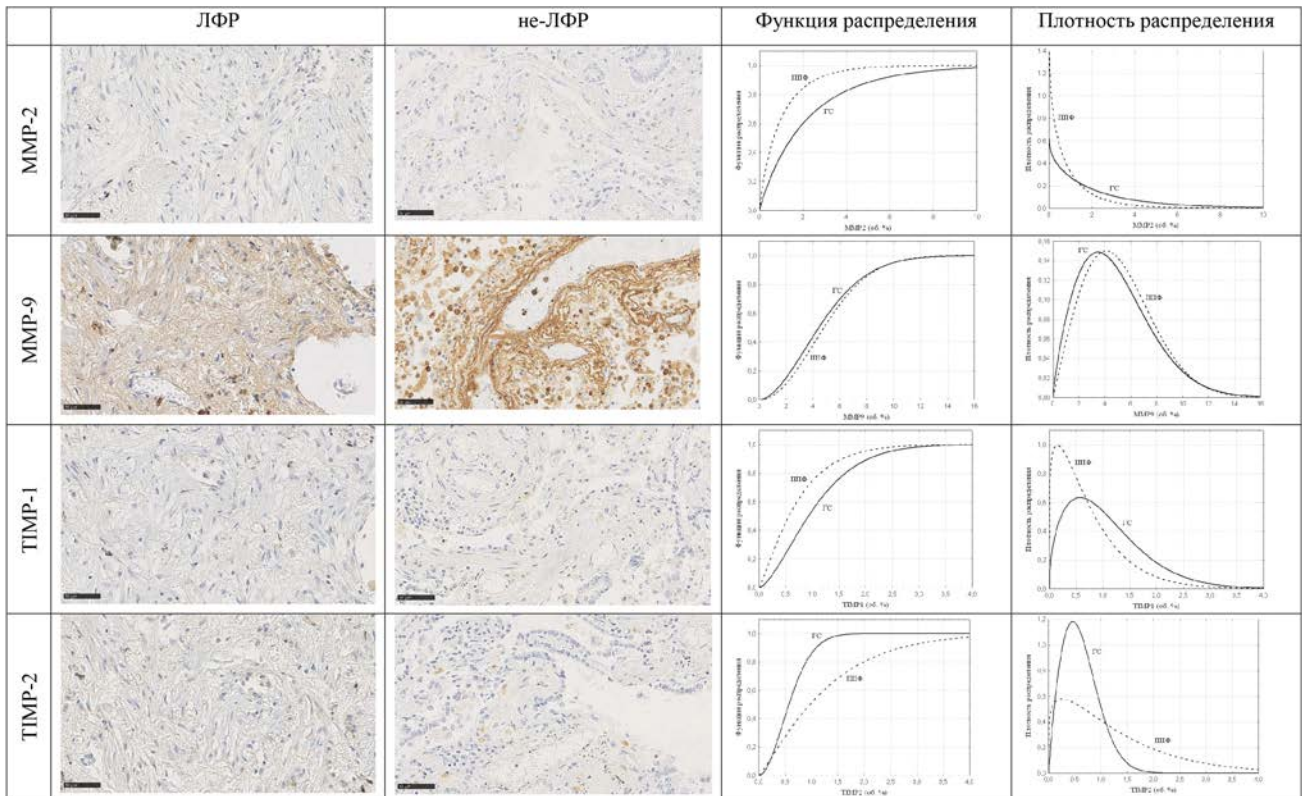
нации в обеих группах варьировали от 0.95 до 0.99) (табл. 4).

Анализ кумулятивных кривых показал, что параметры распределения (медиана и параметр формы) значительно различались между группами для всех исследуемых показателей, за исключением медианного объема (об. %) эпителиальных структур и параметра формы модели для коллагена типа IV (табл. 4). Особенно обращает внимание, что суммарные кривые распределения объемной доли (%) коллагена типа V, значительно различались по медианным значениям (рис. 2) и параметрам формы модели Вейбулла между образцами ЛФР и не-ЛФР.

Результаты анализа корреляционных взаимосвязей изучаемых параметров выявили в 1-й группе (ЛФР) положительную корреляционную связь умеренной степени между суммарной поглощенной в легких дозой внутреннего  $\alpha$ -облучения и огрубением тонкого ретикулярного легочного каркаса

( $r = 0.34; p < 0.05$ ), а также отрицательную корреляционную связь умеренной степени с экспрессией коллагена типа V ( $r = -0.33; p < 0.05$ ). Во 2-й группе была выявлена положительная корреляционная связь умеренной степени между суммарной поглощенной в легких дозой внутреннего  $\alpha$ -облучения и экспрессией коллагена типа V имела характер ( $r = 0.53; p < 0.05$ ).

В результате регрессионного анализа выявлены статистически значимые линейные зависимости указанных выше показателей. В 1-й группе (ЛФР) выявлена статистически значимая положительная зависимость уровня экспрессии MMP-9 от уровня экспрессии TIMP-1 ( $MMP-9 = (4.117 \pm 0.559) + (1.653 \pm 0.549)$ ). В свою очередь, экспрессия TIMP-1 прогрессивно уменьшалась с увеличением суммарной поглощенной в легких дозы внутреннего  $\alpha$ -излучения ( $TIMP1 = (1.256 \pm 0.196) - (0.385 \pm 0.139)$ ).



**Рис. 3.** Экспрессия матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при ЛФР и не-ЛФР. Иммуногистохимический метод с антителами против MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, полимерная тест-система. Увеличение  $\times 400$ . Маркер 50  $\mu\text{m}$ . ЛФР и ППФ — радиационный легочный фиброз, не-ЛФР — нерадикационный легочный фиброз, ГС — группа сравнения (не-ЛФР).

**Fig. 3.** Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in LF and non-LF specimens. Immunohistochemistry with antibodies against MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, the polymer test-system. Magnification  $\times 400$ . Scale 50  $\mu\text{m}$ . LF and ППФ denote plutonium-induced LF, non-LF denote lung fibrosis of a different origin, ГС denotes controls (no pulmonary pathology).

**Таблица 4.** Параметрические характеристики распределений при аппроксимации моделью Вейбулла показателей в 1-й и 2-й группах  
**Table 4.** Parameter characteristics of distributions in the approximation of indicators estimated for groups 1 and 2 using the Weibull's model

Показатель	Характеристики W-model						Значимость различий			
	Группа 1 (n = 56)			Группа 2 (n = 34)			Модуль Me	Уровень значимости P	Модуль V	Уровень значимости P
	Me ± Δ	V ± ΔV	R <sup>2</sup>	Me ± ΔMe	V ± ΔV	R <sup>2</sup>				
Общий объем коллагеновых волокон	12.331 ± 0.050	2.172 ± 0.030	0.997	10.872 ± 0.068	3.153 ± 0.0114	0.989	1.459	<10 <sup>-4</sup>	0.981	<10 <sup>-4</sup>
Ретикулиновые волокна	8.004 ± 0.042	2.156 ± 0.040	0.994	6.213 ± 0.224	1.259 ± 0.086	0.954	1.791	<10 <sup>-4</sup>	0.897	<10 <sup>-4</sup>
Эластические волокна	7.640 ± 0.057	2.353 ± 0.065	0.986	6.892 ± 0.062	3.084 ± 0.154	0.980	0.748	<10 <sup>-4</sup>	0.731	<10 <sup>-4</sup>
Эпителиальные структуры	3.587 ± 0.042	1.493 ± 0.039	0.986	3.658 ± 0.025	2.271 ± 0.056	0.993	0.071	0.291	0.778	<10 <sup>-4</sup>
Collagen type I	7.113 ± 0.031	2.297 ± 0.034	0.996	7.967 ± 0.057	2.259 ± 0.054	0.993	0.854	<10 <sup>-4</sup>	0.038	0.532
Collagen type IV	1.860 ± 0.017	1.458 ± 0.030	0.992	1.695 ± 0.013	1.916 ± 0.044	0.994	0.165	<10 <sup>-4</sup>	0.458	<10 <sup>-4</sup>
Collagen type V	2.740 ± 0.023	1.750 ± 0.038	0.990	1.573 ± 0.025	1.606 ± 0.062	0.982	1.167	<10 <sup>-4</sup>	0.144	0.038
ММР-2	0.650 ± 0.014	0.878 ± 0.024	0.983	1.477 ± 0.035	0.928 ± 0.030	0.987	0.827	<10 <sup>-4</sup>	0,050	0,200
ММР-9	4.80 ± 0.040	2.018 ± 0.053	0.987	4.424 ± 0.060	1.804 ± 0.070	0.984	0.377	<10 <sup>-4</sup>	0.214	0,016
ТИМР-1	0.559 ± 0.006	1.175 ± 0.025	0.991	0.926 ± 0.016	1.511 ± 0.066	0.982	0.367	<10 <sup>-4</sup>	0.335	<10 <sup>-4</sup>
ТИМР-2	0.967 ± 0.011	1.169 ± 0.022	0.992	0.571 ± 0.006	1.865 ± 0.063	0.989	0.396	<10 <sup>-4</sup>	0.696	<10 <sup>-4</sup>
ИРБ	1.254 ± 0.003	4.057 ± 0.059	0.996	1.457 ± 0.011	3.732 ± 0.174	0.978	0.203	<10 <sup>-4</sup>	0.325	0.039

Примечание. Статистически значимое различие параметров распределений (Me и V) в 1-й и во 2-й группах оценивалось с помощью двухстороннего t-критерия Стьюдента.

Дополнительные расчеты с помощью моделей нелинейного регрессионного анализа не дали положительных результатов.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее неоднократно было показано, что условия труда в первые годы работы ПО “Маяк” (1948–1958 гг.) были крайне неблагоприятными [28]. Невозможность обеспечения полной герметизации технологического оборудования, частые ремонты, монтажно-демонтажные работы, низкий уровень автоматизации привели к высоким уровням  $\alpha$ -активных аэрозолей в воздухе производственных помещений. Поскольку средства индивидуальной защиты органов дыхания на ПО “Маяк” не использовались до 1960-х годов, значительное количество  $\alpha$ -активных частиц попадали в организм работников, преимущественно ингаляционным путем, накапливаясь в органах основного депонирования (легкие, печень и скелет) [3, 29].

Большое количество  $\alpha$ -треков и их агрегатов («солнечных вспышек») в рубцах соединительной ткани при автордиографии регистрировали у работников с ЛФР, а единичные  $\alpha$ -треки в периваскулярной и перибронхиальной тканях и во внутрилегочных лимфатических узлах — у работников с пневмофиброзом другого генеза (не-ЛФР) [30].

Исследования распределения плутония в организме работников ПО “Маяк”, основанные на анализе биологических образцов тканей легких, показали, что большая часть  $\alpha$ -активности депонируется в легких и трахеобронхиальных лимфатических узлах [3, 30, 31].

В литературе описаны случаи и патогенез пневмонита и легочного фиброза после лучевой терапии [4, 29, 32–34]. Патогенез легочного фиброза вследствие воздействия альфа-излучения также всесторонне изучался в экспериментах на животных [15, 35, 36]. Изменения, произошедшие на ранней стадии развития ЛФР, включали инфильтрацию очагов фиброза мононуклеарными клетками, окружающими альвеолы, альвеолярные протоки и бронхиолы; повышение уровня клеток альвеолярного эпителия типа II и накопление экссудата. В дальнейшем наблюдались скопления гистиоцитов, поглощающих экссудативный выпот. Имелось значительное утолщение альвеолярных перегородок за счет отека; образование соединительной ткани; и накопление тучных, плазматических и альвеолярных клеток. Разрастание соединительной ткани вокруг альвеол представляет собой морфоло-

гическую основу ЛФР [4, 29, 37]. Показано, что общий объем соединительной ткани в образцах легких при ЛФР увеличен на 40% по сравнению с тканями легких без очагов легочного фиброза [38]. По мнению исследователей, макрофаги по-прежнему остаются основными клетками-мишенями в легочной ткани при воздействии  $\alpha$ -излучения от инкорпорированного плутония, независимо от физико-химических свойств соединений плутония и, вероятно, играют ведущую роль в развитии раннего повреждения легочной ткани [37].

Динамическое наблюдение за работниками ПО “Маяк” позволило выявить профессиональные заболевания (в том числе реакции легочной ткани) на ранних стадиях их развития [8, 9, 1, 2].

Отложение белков ВКМ, таких как коллагены, со структурными искажениями, утолщением альвеолярных стенок и перибронхиолярным и субплевральным фиброзом являются отличительными признаками легочного фиброза. Во время процесса рубцевания баланс между синтезом и деградацией ВКМ смещается в сторону повышенного синтеза, опосредованного факторами роста, включая TGF- $\beta$ 1. Помимо увеличения продукции коллагена фибробластами, TGF- $\beta$ 1 может также способствовать отложению коллагена в легких за счет подавления секреции MMP или стимуляции секреции ее ингибиторов, за счет усиления пролиферации и миграции фибробластов, за счет секреции факторов роста (например, тромбоцитарный фактор роста), или путем индукции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [39].

В настоящем исследовании использованы биологические образцы тканей легких (взятые при аутопсии) работников ПО “Маяк”, которым был поставлен клинический диагноз ЛФР прижизненно, и сравнивали их с образцами тканей легких работников с диагнозом “не-ЛФР” (по результатам аутопсии). Выявлено снижение плотности ретикулярной стромы (коллаген III типа) в обеих исследуемых группах с фиброзом. В то же время очаги ЛФР и не-ЛФР демонстрировали повышенное содержание эластических волокон; при этом их структура была изменена. Никаких отличительных особенностей ни в структуре, ни в составе ретикулярных и эластических волокон не наблюдалось ни в одной из исследуемых групп. Таким образом, сравнительный анализ показал, что изменения соединительнотканного каркаса легких, индуцированные ЛФР, не отличаются от соответствующих изменений, обусловленных легочным фиброзом другой этиологии.

Однако статистический анализ выявил качественные и количественные отличительные морфологические особенности ЛФР по сравнению с не-ЛФР. Результаты статистического анализа подтвердили вывод о том, что ЛФР представляет собой особый тип легочного фиброза с гиперпродукцией коллагена типов IV и V, которые играют ключевую роль в развитии фиброза. В отличие от легочного фиброза, вызванного внутренним  $\alpha$ -излучением от инкорпорированных радионуклидов, легочный фиброз, развившийся в результате исхода хронических заболеваний легких, характеризуется сходными уровнями коллагенов типов I, IV и V фиброзных очагах.

TGF- $\beta$ 1 играет важную роль в развитии легочного фиброза. Повышенная экспрессия TGF- $\beta$ 1 приводит к рекрутированию моноцитов и макрофагов в очаг воспаления, усиливает созревание и активацию фибробластов и стимулирует ЭМП. Сообщалось, что хроническое радиационно-индуцированное поражение легких увеличивает экспрессию и активацию TGF- $\beta$ 1, что приводит к истощению паренхиматозных клеток и избыточному фиброзу [40]. ЭМП играет важную роль в опосредованном TGF фиброгенезе [41]. Результаты этого исследования позволяют предположить, что хроническое воздействие  $\alpha$ -активных нуклидов на легочную ткань индуцирует опосредованную TGF- $\beta$ 1 выработку коллагена типа V при формировании очагов ЛФР. Между тем не-ЛФР, в основном вызванный хроническим воспалением, не демонстрирует повышенных уровней какого-либо определенного типа коллагена в пораженных фиброзом тканях.

Коллаген V типа имеет второстепенное значение, дополняя коллаген типа I, который является основным коллагеном тканей легких. В здоровых легких коллаген типа V расположен в периваскулярной и перибронхиальной соединительной ткани [42, 43]. Коллаген типа V продуцируется в различных мезенхимальных клетках, и экспрессия его генов опосредована TGF. Сообщалось, что коллаген типа V участвует в развитии легочного фиброза вследствие аутоиммунных заболеваний, опосредованных Т-хелперами (Th17), системного склероза [44, 45]. Нарушение регуляции коллагена V типа во время ремоделирования внеклеточного матрикса может объяснить измененную архитектуру фибриллярных коллагенов в интерстиции легких, выступающих в качестве критического промотора легочного фиброза. Активация коллагена типа V наблюдалась при карциномах кожи, раке молочной железы и колоректальном раке [46].

Коллаген типа I является основным фибриллярным компонентом ряда тканей. Скорость резорбции и продукция коллагена типа I увеличиваются примерно в равной степени у пациентов с диагнозом рака легкого, а стимулированный опухолевыми клетками лизис коллагена типа I сопровождается усиленной выработкой того же типа коллагена в тканях легких [47]. Коллаген типа I образует толстые коллагеновые волокна, что было выявлено гистологически, и составляет основную часть коллагена в организме. Этот тип составляет большую часть органической матрицы оснований, но также является основным структурным белком в легких.

Коллаген типа IV был охарактеризован в структурах, идентифицированных морфологически как базальные мембраны. Общеизвестно, что коллаген типа IV не образует волокон или фибрилл, видимых при световом микроскопическом исследовании. Кроме того, сообщалось о роли коллагена типа IV в развитии рака легкого [48].

Изменения ВКМ наблюдались в исследованиях легочного фиброза, индуцированного ХОБЛ, идиопатического легочного фиброза и экспериментальных моделей фиброза, индуцированного блеомицином. Во всех исследованиях было выявлено ремоделирование легочной паренхимы с изменением соотношения коллагенов типов I / III [49–55].

В настоящем исследовании мы наблюдали повышенное содержание коллагена V типа в очагах ЛФР по сравнению с не-ЛФР. В целом наблюдаемые структурные изменения паренхимы легкого в группе не-ЛФР согласуются с результатами других исследований.

Матриксные металлопротеиназы MMP-2 и MMP-9 по своему биологическому действию являются желатиназами и имеют точкой приложения своего воздействия коллаген типа IV и денатурированный коллаген [56]. В литературе отводится большая роль воздействию MMP в развитии пневмосклероза различного генеза, в том числе при системных заболеваниях соединительной ткани, наследственных синдромах, экспериментальном пневмофиброзе и др. [57, 58]. Протеолитическая активность MMP в основном связана с деградацией компонентов ВКМ. Новые данные показывают, что, помимо ремоделирования ВКМ, MMP играют ключевую роль в воспалении, клеточной пролиферации и повреждении сосудов. Следовательно, избыток MMP может способствовать воспалительной реакции и приводить к активации фибробластов, что приводит к ускорению развития фиброза [59].

Активность ММР обычно ингибируется эндогенными тканевыми ингибиторами металлопротеиназ, которые также играют важную роль в поддержании мезенхимального гомеостаза. При этом, опубликованные данные о функциональной роли TIMP-1 в фиброгенезе неоднозначны, хотя преобладают данные, подтверждающие профибротическую функцию TIMP-1 [60]. Кроме того, TIMP-1 оказывает антиапоптотическое действие в лимфоцитах и эпителиальных клетках, а сверхэкспрессия TIMP-1 в клетках рака молочной железы способствует VEGF-опосредованному ангиогенезу [61, 62]. Как антиапоптотический, так и проангиогенный эффекты часто рассматриваются как механизмы развития опухоли.

Полученные в настоящем исследовании результаты хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований, показывающими повышенные уровни ММР в легочной ткани при предопухоловой и опухолевой патологии легких у лиц, длительное время подвергавшихся радиационному воздействию [56].

Мы признаем, что результаты этого исследования следует интерпретировать с осторожностью в связи с его небольшой статистической мощностью. Мы планируем продолжить исследования ВКМ и ЭМП в этих уникальных биологических образцах, собранных у работников, подвергшихся внутреннему альфа-облучению в высоких дозах.

До сих пор существует ряд вопросов, например, могут ли специфические повреждения легочной ткани вследствие внутреннего  $\alpha$ -облучения способствовать повышению риска развития рака легкого, о котором сообщалось ранее в эпидемиологических исследованиях когорты работников ПО “Маяк” [14, 16, 63]. Следует отметить, что к концу периода наблюдения (31.12.2018 г.) рак легкого был зарегистрирован у 36.2% работников с ЛФР [5].

Лучшее понимание молекулярных механизмов развития легочного фиброза при профессиональном хроническом облучении может помочь в поиске новых биологических маркеров и идентификации биологических мишеней для широкого круга заболеваний, связанных с легочным фиброзом различной этиологии [64].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенез фиброза представляет собой многоэтапный процесс, инициируемый повреждением органа и приводящий к интегральной реакции с участием воспалительных клеток, активации каскада

цитокинов, факторов роста и в конечном итоге — к ремоделированию внеклеточного матрикса.

В результате проведенного исследования обнаружены качественные и количественные морфологические особенности ЛФР при сравнении с ЛФ другого генеза, позволяющие заключить, что ЛФР — это особый тип пневмофиброза, при котором отмечены особенности локализации и архитектоники очагов фиброза легочной ткани, нарушения содержания коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон легочной стромы. Анализ показал, что гиперпродукция коллагена типа V играет ключевую роль в развитии ЛФР. Кроме этого, в развитии пневмофиброза важную роль играет нарушение баланса между экспрессией ММР и их ингибиторов. Высокий уровень ММР в очагах пневмофиброза у лиц, подвергшихся профессиональному хроническому внутреннему  $\alpha$ -облучению, может способствовать разрушению белков экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран и ремоделированию соединительной ткани легких. В результате деградации матрикса под действием ММР образуются биологически активные соединения, оказывающие влияние на дифференцировку и пролиферацию клеток. Таким образом, нельзя исключить влияние дисбаланса в системе ММР на развитие неопластических процессов в легочной ткани. Возможно, нарушение регуляции экспрессии коллагена V типа при ремоделировании внеклеточного матрикса может объяснить нарушенную архитектуру фибриллярных коллагенов легочного интерстиция и является критическим фактором, способствующим развитию легочного фиброза.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России в рамках контракта от 11 июня 2021 г. № 27.501.21.2 “Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО “Маяк” и население Уральского региона” (шифр: “Медицинские последствия-21”).

The work was financially supported by the Federal Medical and Biological Agency under contract No. 27.501.21.2 dated June 11, 2021 “Modernization of high-tech methods aimed at identifying the medical consequences of radiation exposure on the personnel of the Mayak Production Association and the population of the Ural region” (code “Medicinskie posledstviya-21”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуськова А.К., Байсоголов Г.Д. Лучевая болезнь человека. М.: Медицина, 1971; 382 с. [Guskova A.K., Baisogolov G.D. Luchevaya bolizn cheloveka = Human Radiation Syndrome (Sketches). Moscow: Medicine, 1971. 382 p. (In Russ.)].
2. Guskova A., Baisogolov G.D. Radiation Sickness in Man (Outlines). New York: United Nations, 1971.
3. Плутоний. Радиационная безопасность. Под ред. Л.А. Ильина. М.: ИздАТ, 2005. 416 с. [Plutoniye. Radiatsionnaya bezopasnost = Plutonium. Radiation safety. Edited by Ilyin L.A. Moscow: IzdAT, 2005. 416 p. (In Russ.)].
4. Authors on behalf of ICRP; Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M., Hendry J.H., Kleiman N.J., Macvittie T.J., Aleman B.M., Edgar A.B., Mabuchi K., Muirhead C.R., Shore R.E., Wallace W.H. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs—hreshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*. 2012;41(1-2):1–322. <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2012.02.001>
5. Azizova T., Moseeva M., Grigoryeva E. et al. Registry of Plutonium-induced Lung Fibrosis in a Russian Nuclear Worker Cohort. *Health Phys*. 2020;118(2):185–192. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001131>
6. Волкова Л.Г. Пневмосклероз как исход лучевой болезни, вызванной длительной интоксикацией плутонием. *Бюлл. радиац. медицины*. 1961;2:82–91. [Volkova L.G. Pnevmoskleroz kak iskhod luchevooy bolezni, vyzvannoy dlitel'noy intoksikatsiyey plutoniyem. *Bulletin of Radiation Medicine*. 1961;2:82–91 (in Russ.)].
7. Azizova T.V., Day R.D., Wald N. et al. N.G., Stetsenko L.A., Grigoryeva E.S., Krupenina L.N., Vlasenko E.V. The “clinic” medical-dosimetric database of Mayak production association workers: structure, characteristics and prospects of utilization. *Health Phys*. 2008;94(5):449–58. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000300757.00912.a2>
8. Azizova T.V., Zhuntova G.V., Haylock R. et al. Chronic bronchitis incidence in the extended cohort of Mayak workers first employed during 1948–1982. *Occup. Environ. Med*. 2017;74(2):105–113. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103283>
9. Azizova T., Briks K., Bannikova M., Grigoryeva E. Hypertension Incidence Risk in a Cohort of Russian Workers Exposed to Radiation at the Mayak Production Association Over Prolonged Periods. *Hypertension*. 2019;73(6):1174–1184. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11719>
10. Azizova T.V., Grigoryeva E.S., Haylock R.G. et al. Ischaemic heart disease incidence and mortality in an extended cohort of Mayak workers first employed in 1948–1982. *Br. J. Radiol*. 2015;88(1054):20150169. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150169>
11. Azizova T.V., Bannikova M.V., Grigoryeva E.S., Rybkina V.L. Risk of malignant skin neoplasms in a cohort of workers occupationally exposed to ionizing radiation at low dose rates. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205060>
12. Loffredo C., Goerlitz D., Sokolova S. et al. The Russian Human Radiobiological Tissue Repository: A Unique Resource for Studies of Plutonium-Exposed Workers. *Radiat. Prot. Dosim*. 2017;173(1-3):10–15. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncw303>
13. Sokolnikov M.E., Gilbert E.S., Preston D.L. et al. Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers. *Int. J. Cancer*. 2008;123(4):905–11. <https://doi.org/10.1002/ijc.23581>
14. Gilbert E.S., Sokolnikov M.E., Preston D.L. et al. Lung cancer risks from plutonium: an updated analysis of data from the Mayak worker cohort. *Radiat. Res*. 2013;179(3):332–42. <https://doi.org/10.1667/RR3054.1>
15. Koshurnikova N.A., Aristov V.P., Lemberg V.K. et al. Mechanism of development of plutonium-induced pulmonary sclerosis. *Health Phys*. 1972;22(6):753–4. <https://doi.org/10.1097/00004032-197206000-00033>
16. Tokarskaya Z.B., Okladnikova N.D., Belyaeva Z.D., Drozhko E.G. The influence of radiation and non-radiation factors on the lung cancer incidence among the workers of the nuclear enterprise Mayak. *Health Phys*. 1995;69(3):356–66. <https://doi.org/10.1097/00004032-199509000-00007>
17. Ashcroft T., Simpson J.M., Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol*. 1988;41(4):467–70. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.4.467>
18. Hübner R.H., Gitter W., El Mokhtari N.E. et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008;44(4):507–11, 514–7. <https://doi.org/10.2144/000112729>
19. Есипова И.К. Патологическая анатомия легких. М.: Медицина, 1976. 183 с. [Esipova I.K. Patologicheskaya anatomiya legkih = Pathological anatomy of the lungs. Moscow: Medicine, 1976. 183 p. (in Russ.)].
20. Allen D.C., Cameron R.I., ed. Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. 2nd ed. Berlin (Germany): Springer, 2013. 512 p.
21. Suvarna K., Layton C., Bancroft J.D. Bancroft’s theory and practice of histological techniques. 8th ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier, 2018. 672 p.
22. Sychugov G., Azizova T., Osovets S. et al. Morphological features of pulmonary fibrosis in workers occupationally exposed to alpha radiation. *Int. J. Radiat. Biol*. 2020;96(4):448–460. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1721601>
23. Rydell-Törmänen K., Andréasson K., Hesselstrand R. et al. Extracellular matrix alterations and acute inflammation; developing in parallel during early induction of pulmonary fibrosis. *Lab. Invest*. 2012;92(6):917–25. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.57>
24. Gilhodes J.C., Julé Y., Kreuz S. et al. Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170561>
25. Lawson C.L., Hanson R.J. Solving Least Squares Problems. Revised republication. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1996. 352 p.
26. Draper N.R., Smith H. Applied Regression Analysis, 3rd edition. New York: John Wiley&Sons, 1998. 736 p.
27. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика: монография. М.: Физматлит, 2012. 816 с. [Kobzar A.I. Prikladnaya matematicheskaya statistika = Applied Mathematical Statistics. Moscow: Fizmatlit, 2012. 816 p. (in Russ.)].



28. Kruglov A. The History of the Soviet Atomic Industry. London: Taylor and Francis, 2002. 288 p.
29. Дощенко Н.В., Кисловская И.Л., Лемберг В.К., Нифатов А.П. Клинико-морфологическая характеристика плутониевого пневмосклероза различных стадий. *Бюлл. радиац. медицины*. 1967;3:32–46. [Doshchenko N.V., Kislovskaya I.L., Lemberg V.K., Nifatov A.P. Kliniko-morfologicheskaya kharakteristika plutoniyevoogo pnevmosklerozaz razlichnykh stadiy. *Bulletin of Radiation Medicine*. 1967;3:32–46 (in Russ.)].
30. Hahn F.F., Romanov S.A., Guilmette R.A., Nifatov A.P., Zaytseva Y.V., Diel J.H., Allen S.W., Lyovkina Y.V. Distribution of plutonium particles in the lungs of Mayak workers. *Radiat. Prot. Dosimy*. 2003;105(1-4):81–4. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006326>
31. Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 2. Ingestion dose coefficients. A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection. *Ann. ICRP*. 1993;23(3-4):1–167.
32. Coggle J.E., Lambert B.E., Moores S.R. Radiation effects in the lung. *Environ Health Perspect*. 1986;70:261–91. <https://doi.org/10.1289/ehp.8670261>
33. McDonald S., Rubin P., Phillips T.L., Marks L.B. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 1995;31(5):1187–203. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00429-0](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00429-0)
34. Bentzen S.M., Skoczylas J.Z., Bernier J. Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions. *Int. J. Radiat. Biol*. 2000;76(4):453–62. <https://doi.org/10.1080/095530000138448>
35. Brooks A.L., Guilmette R.A., Hahn F.F. et al. Distribution and biological effects of inhaled  $^{239}\text{Pu}(\text{NO}_3)_4$  in cynomolgus monkeys. *Radiat. Res*. 1992;130(1):79–87.
36. Park J.F., Watson C.R., Buschbom R.L. et al. Biological effects of inhaled  $^{239}\text{PuO}_2$  in Beagles. *Radiat. Res*. 2012;178(5):447–67. <https://doi.org/10.1667/RR2504.1>
37. Van der Meer A., Gremy O., Renault D. et al. Plutonium behavior after pulmonary administration according to solubility properties, and consequences on alveolar macrophage activation. *J. Radiat. Res*. 2012;53(2):184–94. <https://doi.org/10.1269/jrr.11112>
38. Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В. и др. Иммуноморфологические особенности пневмофиброза у работников плутониевого производства. *Уральский мед. журн*. 2014;8(122):71–76. [Sychugov G.V., Kazachkov E.L., Azizova T.V. et al. Immunomorphological characteristics of pneumofibrosis at workers of plutonium manufacture. *Ural. Med. J. Pathomorphology*. 2014;8(122):71–76 (In Russ.)].
39. Urawa M., Kobayashi T., D'Alessandro-Gabazza C.N. et al. Protein S is protective in pulmonary fibrosis. *J. Thromb. Haemost*. 2016;14(8):1588–99. <https://doi.org/10.1111/jth.13362>
40. Almeida C., Nagarajan D., Tian J. et al. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PLoS One*. 2013;8(1):e53628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053628>
41. Tabata C., Kadokawa Y., Tabata R. et al. All-trans-retinoic acid prevents radiation- or bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2006;174(12):1352–60. <https://doi.org/10.1164/rccm.200606-862OC>
42. Madri J.A., Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol*. 1980;11(4):353–66. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(80\)80031-1](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(80)80031-1)
43. Yoshida S., Haque A., Mizobuchi T. et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am. J. Transplant*. 2006;6(4):724–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01236.x>
44. Parra E.R., Aguiar A.C. Jr, Teodoro W.R. et al. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin. Respir. J*. 2009;3(3):135–42. <https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2008.00118.x>
45. Sullivan J.A., Jankowska-Gan E., Hegde S. et al. Th17 Responses to Collagen Type V,  $\alpha 1$ -Tubulin, and Vimentin Are Present Early in Human Development and Persist Throughout Life. *Am. J. Transplant*. 2017 Apr;17(4):944–956. <https://doi.org/10.1111/ajt.14097>
46. Mak K.M., Png C.Y., Lee D.J. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2016;299(5):613–29. <https://doi.org/10.1002/ar.23330>
47. Kobayashi T., Gabazza E.C., Taguchi O. et al. Type I collagen metabolites as tumor markers in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 1999;85(9):1951–7.
48. Polette M., Thiblet J., Ploton D. et al. Distribution of  $\alpha 1(\text{IV})$  and  $\alpha 3(\text{IV})$  chains of type IV collagen in lung tumours. *J. Pathol*. 1997;182(2):185–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199706\)182:2<185::AID-PATH828>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<185::AID-PATH828>3.0.CO;2-F)
49. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(35):13180–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605669103>
50. Dunsmore S.E. Treatment of COPD: a matrix perspective. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2008;3(1):113–22. <https://doi.org/10.2147/copd.s1119>
51. Suki B., Bates J.H. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 2008;163(1-3):33–43. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.03.015>
52. Burgstaller G., Oehrle B., Gerckens M. et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur. Respir. J*. 2017;50(1):1601805. <https://doi.org/10.1183/13993003.01805-2016>
53. Désogère P., Tapias L.F., Hariri L.P. et al. Type I collagen-targeted PET probe for pulmonary fibrosis detection and staging in preclinical models. *Sci. Transl. Med*. 2017;9(384):eaaf4696. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf4696>
54. O'Dwyer D.N., Moore B.B. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell Mol. Life Sci*. 2017;74(23):4305–4314. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2649-z>
55. Jones M.G., Andriotis O.G., Roberts J.J. et al. Nanoscale dysregulation of collagen structure-function disrupts mechano-homeostasis and mediates pulmonary fibrosis. *Elife*. 2018;7:e36354. <https://doi.org/10.7554/eLife.36354>

56. Сагиндикова Г.Е., Коган Е.А., Сатбаева Э.Б., Парамонова Н.Б. Матриксные металлопротеиназы, их ингибиторы и ангиогенез при различных морфологических вариантах предрака легкого у жителей радиоактивно-загрязненных территорий семипалатинской области Казахстана. *Арх. патол. науки.* 2008;70(2):21–25. [Sagindikova G.E., Kogan E.A., Satbayeva E.B., Paramonova N.B. Matrix metalloproteinases, their inhibitors and angiogenesis in different morphological types of lung precancer in persons who have long lived in the radioactive substance-polluted area of the Semipalatinsk Region, Kazakhstan. *Arkh. Patol.* 2008;70(2):21–5 (In Russ.)].
57. Vafashoar F., Mousavizadeh K., Poormoghim H. et al. Gelatinases Increase in Bleomycin-induced Systemic Sclerosis Mouse Model. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 2019;18(2):182–189.
58. Summer R., Krishna R., Schriener D. et al. Matrix metalloproteinase activity in the lung is increased in Hermansky-Pudlak syndrome. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2019;14(1):162.  
<https://doi.org/10.1186/s13023-019-1143-0>
59. Adamidis K.N., Kopaka M.E., Petraki C. et al. Iomerular expression of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus in association with activity index and renal function. *Ren. Fail.* 2019;41(1):229–237.  
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2019.1591998>
60. Thiele N.D., Wirth J.W., Steins D. et al. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Sci. Rep.* 2017;7(1):714.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00671-1>.
61. Song T., Dou C., Jia Y. et al. TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(14):12061–79.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3616>
62. Yoshiji H., Harris S.R., Raso E. et al. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int. J. Cancer.* 1998;75(1):81–7.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980105\)75:1<81::aid-ijc13>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980105)75:1<81::aid-ijc13>3.0.co;2-g)
63. Кошурникова Н.А., Сокольников М.Э., Фомин Е.П. Избыточный относительный риск заболеваемости раком легкого в зависимости от гистотипа опухоли. *Вопр. радиац. безопасности.* 2014;4(76):62–69. [Koshurnikova N.A., Sokolnikov M.E., Fomin E.P. Excess relative lung cancer risk depending on the histological type of the tumor. *J. Radiat. Saf. Issue.* 2014;4(76):62–69 (In Russ.)].
64. Flechsig P., Dadrich M., Bickelhaupt S. et al. LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- $\beta$  and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(13):3616–27.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2855>

## Pathomorphological Features of Lung Fibrosis in Individuals Occupationally Exposed to Alpha Radiation

G. V. Sychugov<sup>1</sup>, T. V. Azizova<sup>2,\*</sup>, S. V. Osovets<sup>2</sup>, E. L. Kazachkov<sup>1</sup>,  
E. S. Grigoryeva<sup>2</sup>, A. G. Sychugov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University affiliated, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup>Southern Urals Biophysics Institute affiliate, Federal Medical Biological Agency, Ozyorsk, Russia

\*E-mail: clinic@subi.su

The aim of this study was to search for the specific morphological features of radiation-induced lung fibrosis compared to pulmonary fibrosis of another origin, using biological specimens of lung tissue collected from workers internally exposed to alpha radiation. The morphological features of lung fibrosis were defined using biological specimens of lung tissue that had been collected during autopsy examinations from 56 workers diagnosed with plutonium-induced lung fibrosis during life, from 34 workers with lung fibrosis of another origin (due to chronic inflammatory lung diseases) and from 35 workers without clinical pulmonary pathology (controls). The total lung-absorbed dose of gamma radiation from external exposure did not significantly differ among the studied groups, and the total lung-absorbed dose of alpha radiation from internal exposure was significantly higher in workers with plutonium-induced lung fibrosis. To investigate the extracellular matrix components, mono- and polyclonal labeled antibodies against type I, IV, and V collagens were used. In addition, to evaluate the system of extracellular matrix metabolism regulation, the antibodies against matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 were used. The study revealed qualitative and quantitative morphological peculiarities of plutonium-induced lung fibrosis compared to lung fibrosis of another origin. This allows us to conclude that plutonium-induced lung fibrosis is a specific type of lung fibrosis, which is characterized with specific location and architectonics of fibrosis foci within the lung, and with changes in levels of collagen, elastic and reticular fibers in the pulmonary stroma. The analysis demonstrated that hyperproduction of type V collagen plays a key role in the development of plutonium-induced lung fibrosis. In addition, the imbalance between the expression of MMPs and their inhibitors plays an important role in the development of lung fibrosis.

**Keywords:** occupational radiation exposure, alpha radiation, lung fibrosis, extracellular matrix, Mayak PA

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сычугов Глеб Вячеславович (Sychugov Gleb V.) —  
e-mail: docsgv@yandex.ru;  
<https://orcid.org/0000-0003-3251-6944>

Азизова Тамара Васильевна (Azizova Tamara V.) —  
e-mail: clinic@subi.su;  
<https://orcid.org/0000-0001-6954-2674>

Осовец Сергей Васильевич (Osovets Gergey V.) —  
e-mail: osovets1@yandex.ru;  
<https://orcid.org/0000-0002-6180-2061>

Казачков Евгений Леонидович (Kazachkov Evgeniy L.) —  
e-mail: doctorkel@yandex.ru;  
<https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

Григорьева Евгения Сергеевна (Grigoryeva Evgeniya S.) —  
e-mail: grig@subi.su;  
<https://orcid.org/0000-0003-1806-9922>

Сычугов Александр Глебович (Sychugov Aleksander G.) —  
e-mail: docsgv@yandex.ru;  
<https://orcid.org/0009-0004-4803-1022>

**Вклад авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

The authors contributed equally to this article.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

The authors declare no conflicts of interests.

УДК 628.1.033:612.67:599.323.4:57.084.1:539.1.047

## ВОДОПРОВОДНАЯ ВОДА СОКРАЩАЕТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ МЫШЕЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ФРАКЦИОНИРОВАННОМ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ

© 2024 г. О. В. Никитенко<sup>1,2\*</sup>, Т. М. Бычкова<sup>1,2</sup>, Д. М. Утина<sup>3</sup>,  
В. Н. Гаевский<sup>3</sup>, И. Б. Ушаков<sup>2</sup>, А. А. Иванов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических проблем  
Российской академии наук, Москва, Россия

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

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

\*E-mail: dorozhkina88@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г

Оценка роли социально-бытовых факторов в формировании радиорезистентности при хроническом облучении и изыскание способов ее повышения являются важными для понимания механизмов повреждающего действия радиации и разработки практических методов снижения радиационного риска у профессионалов, контактирующих с ионизирующим излучением и пациентов, подвергающихся лучевой терапии. В данной работе исследовали способность повлиять на продолжительность жизни животных, подвергшихся воздействию  $\gamma$ -излучения фракционно в течение длительного времени, путем замены питьевой воды с водопроводной на дистиллированную. Самки мышей ICR (CD-1) были подвержены воздействию тотального  $\gamma$ -излучения <sup>60</sup>Co еженедельно фракционно в течение 33 нед, начиная с возраста 9 нед. Доза однократного облучения составила 50 мГр, средняя мощность дозы 2 мГр/с. Суммарная доза облучения составила 1.65 Гр. Контрольные необлученные мыши и облученные животные были разделены на две группы. Первая получала водопроводную воду, а вторая — дистиллированную в течение всего эксперимента. У необлученных животных, содержащихся на водопроводной воде, отмечено статистически незначимое ( $p = 0.483$ , log-rank test) сокращение средней продолжительности жизни по сравнению с мышами, содержащимися на дистиллированной воде. У животных после воздействия  $\gamma$ -излучения <sup>60</sup>Co отмечено статистически значимое ( $p = 0.0013$ ) снижение продолжительности жизни при содержании на водопроводной воде и статистически незначимое ( $p = 0.1511$ ) при содержании на дистиллированной воде. Водопроводная вода и облучение проявили отчетливый синергизм при комбинированном воздействии на организм мышей, выразившийся в более чем трехкратном уменьшении срока пострадиационного укорочения продолжительности жизни. Дистиллированная вода снизила скорость гибели облученных животных и модифицировала скорость гибели необлученных животных. Наши данные демонстрируют тот факт, что сокращение продолжительности жизни мышей, содержащихся на водопроводной воде, вызванное длительным фракционированным облучением, может быть снижено при содержании животных на дистиллированной воде.

**Ключевые слова:** фракционированное длительное  $\gamma$ -облучение, водопроводная и дистиллированная вода, сокращение продолжительности жизни, мышьяная модель

**DOI:** 10.31857/S0869803124020083, **EDN:** NAUHFA

Расчеты риска, обусловленного ионизирующим излучением, базируются на эпидемиологическом изучении населения, выжившего после атомных бомбардировок в Хиросиме и Нагасаки [1,2], персонала предприятий атомной промышленности [3], населения, проживающего в зоне их влияния [4], и в меньшей степени — лиц, подвергшихся лучевой терапии. Несмотря на высокую ценность данных радиационной эпидемиологии, они бывают сложны для обсуждения с точки зрения дозиметрии и социально-экономических и территориальных особенностей различных исследованных групп.

В этой связи эксперименты на животных, проводимые при дозиметрическом контроле различных условий облучения, а также условий содержания животных, являются важной научной поддержкой для обоснования допустимых радиационных рисков [5–7].

Начиная с 1960-х годов в Институте медико-биологических проблем РАН были проведены систематические исследования, в том числе хронический эксперимент на собаках [8], по оценке радиационных рисков для космонавтов в ходе длительных космических полетов. В экспериментах, проводимых

в ИМБП РАН и за рубежом, в качестве средств снижения повреждающих эффектов радиации помимо фармакологических препаратов, использовали различные водные режимы, в том числе воду с пониженным содержанием дейтерия [9, 10]. Дискуссия вокруг возможности токсических и канцерогенных эффектов водопроводной воды, содержащей остаточный хлор и хлорорганические соединения [11, 12], подтолкнула нас к необходимости исследования комбинированного воздействия длительного фракционированного  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  и водопроводной воды, что и стало целью нашей работы. Подобного подхода к проблеме в доступной литературе мы не встретили. Анализ продолжительности жизни экспериментальных животных проведен в настоящей работе. Другие соматические и поведенческие показатели состояния животных, использованные в этой работе, будут приведены в следующей статье.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

### *Мыши и их содержание*

Эксперимент выполнен на 80 самках мышей SPF-категории, аутбредных ICR (CD1), полученных из Питомника лабораторных животных РАН г. Пущино. Животных содержали в конвенциональных условиях в пластиковых клетках (площадь пола 710 см<sup>2</sup>) по 10 животных. Каждая клетка имела этикетку, на которой были указаны исходное число животных, вид воды, дата начала эксперимента, дата облучения, даты гибели животных. Клетки осматривали ежедневно. Клетки находились в комнате площадью 15 м<sup>2</sup>, с потолками высотой 3 м, при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажности  $60 \pm 10\%$ , естественном освещении и атмосферном давлении, с принудительной вентиляцией. Мыши получали стандартный гранулированный корм фирмы “Чара” для SPF-грызунов (ad libitum). В качестве подстилки использовали стружку лиственных пород деревьев. Половина животных получали водопроводную воду, соответствующую ГОСТу [СанПиН 2.1.4.1074-01] из муниципального водопровода г. Дубна Московской области, а вторая — свежеприготовленную дистиллированную воду без дополнительной очистки, с электропроводностью менее 5 мСм/м. Измерение объема выпитой воды и замену бутылок проводили еженедельно.

Обслуживающий персонал использовал защитную одежду: халаты, маски, перчатки, шапочки и сменную обувь.

Возраст мышей при поступлении был 4 нед. После наблюдения в течение 5 нед и контроля роста

массы мышей было начато радиационное воздействие. Средняя исходная масса тела мышей в четырех группах, рандомизированных по массе животных, составила 26.5 г.

### *Экспериментальные группы по 20 мышей*

Группа № 1 — мыши получали водопроводную воду и были облучены.

Группа № 2 — мыши получали водопроводную воду и не были облучены (ложнооблученный, транспортный контроль).

Группа № 3 — мыши получали дистиллированную воду и были облучены.

Группа № 4 — мыши получали дистиллированную воду и не были облучены (ложнооблученный, транспортный контроль).

### *Облучение*

Животных подвергали воздействию  $\gamma$ -квантов от источника, содержащего  $^{60}\text{Co}$ , на медицинской установке “Рокус М”. Тотальное, одностороннее в дорсовентральном направлении облучение проводили в пластиковом радиационно-проницаемом контейнере, ограничивающем вертикальное перемещение животных, одновременно по 10 мышей. Дозиметрию осуществляли с помощью дозиметра RTW UNIDOS-E с ионизационной камерой ТМ30013-03378. Облучение животных групп № 1 и 3 было начато при возрасте мышей 9 нед и проводилось 1 раз в неделю в дозе 50 мГр при средней мощности дозы 2 мГр/с. Проведено 33 сеанса в суммарной дозе 1.65 Гр.

Эксперименты проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977) и “Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных” Совета международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1985 г. Исследование одобрено на заседании местного Комитета по биоэтике (Протокол № 136 от 2 июня 2004 г.) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России).

### *Статистический анализ*

Среднюю продолжительность жизни мышей оценивали по средней арифметической и ошибке средней ( $M \pm m$ ) сут, а также по медиане (Me). Статистическую значимость различий определяли по критерию Стьюдента и  $U$ -критерию Манна–Уитни. При анализе динамики выживаемости мышей был использован метод Каплана–Майера [13]. Кривые

выживаемости были проанализированы log-rank тестами для средних продолжительностей жизни. Скорость гибели животных в зависимости от возраста определяли по методу Гомпертца [14] для разных возрастных групп, начиная с возраста 290 сут, т.е. после окончания облучения, с временным интервалом 150 сут. Скорость смертности ( $\omega_t$ ) рассчитывали по формуле [14]:

$$\omega_t = \frac{1}{2h} \log_e \frac{N(t-h)}{N(t+h)},$$

где  $2h$  — временной интервал,  $N(t)$  — число выживших животных за время  $t$ .

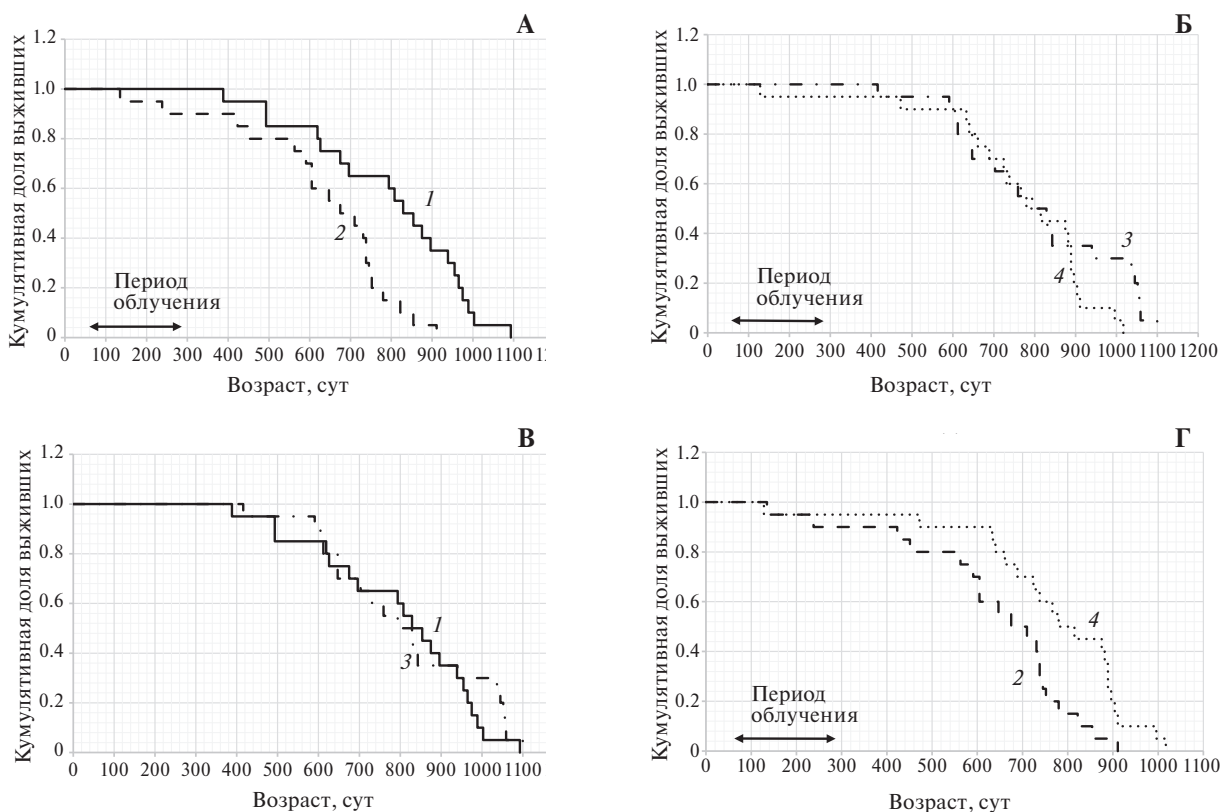
Для установления симметричности распределения показателя средней продолжительности жизни нами была использована стандартная формула:

$$A_s = \frac{\mu_3}{\sigma^3},$$

где  $\mu$  — среднее отклонение индивидуальных значений признака от его среднеарифметической величины (центральный момент третьего порядка),  $\sigma^3$  — среднее квадратичное отклонение, возведенное в третью степень.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, характеризующие выживаемость мышей, подверженных воздействию  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  фракционно в суммарной дозе 1.65 Гр, и необлученных мышей представлены на рис. 1 и табл. 1. В табл. 1 показана средняя продолжительность жизни этих мышей ( $M$ ). Необлученные мыши, содержащиеся на водопроводной воде, прожили в среднем 798.3 сут, а на дистиллированной — 814.9 сут. Разница составила 16.6 сут, однако эти различия не были статистически значимыми ( $p = 0.483$ , log-rank test). Длительное фракционное воздействие  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  статистически значимо снизило среднюю



**Рис. 1.** Кумулятивная выживаемость мышей ICR (CD-1) по Каплану–Майеру облученных фракционно в суммарной дозе 1.65 Гр и необлученных: А — облученные (2) и необлученные (1), содержащиеся на водопроводной воде; Б — облученные (4) и необлученные (3), содержащиеся на дистиллированной воде; В — необлученные, содержащиеся на водопроводной (1) и дистиллированной (3) воде; Г — облученные, содержащиеся на водопроводной (2) и дистиллированной (4) воде.

**Fig. 1.** Cumulative survival of ICR mice (CD-1) according to Kaplan–Meier fractionally irradiated in a total dose of 1.65 Gy and unirradiated: А — irradiated (2) and non-irradiated (1), kept on tap water; В — irradiated (4) and non-irradiated (3), kept on distilled water; С — non-irradiated, kept on tap (1) and distilled (3) water; D — irradiated, kept on tap (2) and distilled (4) water.

**Таблица 1.** Показатели выживаемости мышей, самок ICR (CD-1), содержащихся на водопроводной (ВВ) и дистиллированной (ДВ) воде в ходе и после еженедельного фракционированного воздействия  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  (50 мГр  $\times$  33 фракции) в возрастной период 60–290 сут

**Table 1.** Survival rates of mice, females, ICR (CD-1), kept on tap (TW) and distilled (DW) water during and after weekly fractionated exposure to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -radiation (50 mGy  $\times$  33 fractions) at the age of 60–290 days

Группы мышей	Показатели		
	СПЖ, ( $M \pm m$ ) сут	СПЖ, Me	коэффициент асимметрии, $A_s$
Облученные. содержащиеся на ВВ	635.7 $\pm$ 44.1	692.5	–1.2
Необлученные. содержащиеся на ВВ	798.3 $\pm$ 43.8*	841.5	–0.6
Облученные. содержащиеся на ДВ	765.3 $\pm$ 45.2*	797.5	–1.7
Необлученные. содержащиеся на ДВ	814.9 $\pm$ 44.4*	811.5	–0.1

Примечания. СПЖ — средняя продолжительность жизни; \* статистически значимые различия по сравнению с группой № 1 ( $t$ -критерий Стьюдента  $p \leq 0.05$ .  $U$ -критерий Манна–Уитни  $p \leq 0.01$  и log-rank test  $p \leq 0.05$ ).

продолжительность жизни мышей, содержащихся на водопроводной воде, на 162.6 сут, с 798.3 сут до 635.7 ( $p = 0.0013$ ). Средняя продолжительность жизни облученных мышей, содержащихся на дистиллированной воде, составила 765.3 сут, а контрольных необлученных 814,9 сут. Разница составила 49.6 сут. Однако это различие оказалось статистически незначимым, ни по одному из использованных критериев ( $p = 0.15$  log-rank test), в силу малого числа животных в экспериментальных группах. Средние продолжительности жизни облученных мышей, содержащихся на водопроводной и дистиллированной воде, составили 635.7 и 765.3 сут соответственно. Содержание облученных мышей на дистиллированной воде статистически значимо повысило их продолжительность жизни на 129.6 сут ( $p = 0.01$ , log-rank test) по сравнению с водопроводной водой, что указывает на способность дистиллированной воды снижать способность длительного фракционированного воздействия  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  укорачивать продолжительность жизни.

На рис. 1, А виден отчетливый левый сдвиг кривой выживания облученных мышей, содержащихся на водопроводной воде, по отношению к необлученным животным. На рис. 1, Г наблюдается отчетливый левый сдвиг кривой выживания облученных мышей, содержащихся на ВВ, по отношению к облученным мышам, содержащимся на ДВ. На рис. 1, Б левый сдвиг кривой выживания облученных мышей, содержащихся на ДВ, по отношению к необлученным мышам, содержащимся на ДВ, наблюдается лишь в период 900–1000 суток жизни. Минимальные различия, небольшой левый сдвиг, наблюдается кривой выживания необлученных мышей, содержащихся на ВВ (рис. 1, В), по отношению к кривой выживания необлученных

мышей, содержащихся на ДВ в возрасте после 900 сут.

Скорости смертности мышей в различные возрастные периоды характеризуют кривые Гомпертца (рис. 2), построенные для всех групп мышей.

Логарифм скорости смертности мышей является функцией их возраста. Во всех группах мышей отмечается прогрессивное повышение скорости смертности при увеличении возраста, однако в различных группах имеются особенности уровня скорости смертности на отдельных участках кривых Гомпертца. Зависимость скорости смертности у облученных мышей, содержащихся как на ВВ, так и на ДВ носили прямолинейный характер, при этом во всех возрастных интервалах скорость смертности в группе мышей, содержащихся на ВВ превысила показатель у животных, содержащихся на ДВ (рис. 2, Г). У необлученных животных имело место кратковременное увеличение скорости смертности — более раннее на 400 сут у мышей, потреблявших ВВ, и несколько смещенное в область 600 сут у животных, получавших ДВ (рис. 2, А, 2, Б).

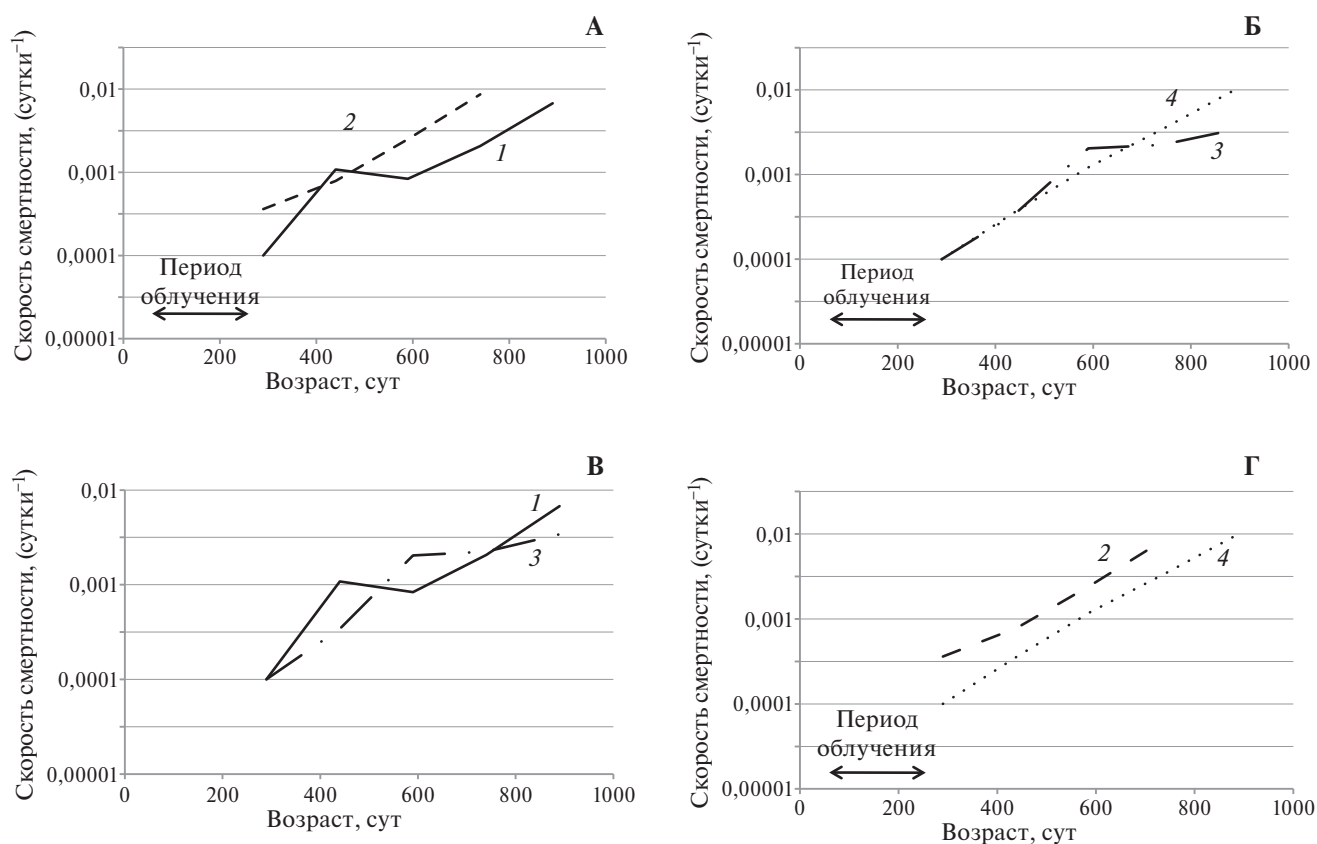
При сопоставлении (табл. 1) результатов оценки СПЖ по средней арифметической ( $M$ ) и медиане ( $Me$ ) выявлено существенное различие:  $Me$  в 1–3-ей группах оказалась выше, чем  $M$ . Это различие подтвердил расчет коэффициента асимметрии ( $A_s$ ) распределений по СПЖ во всех группах. Установлено наличие отрицательной асимметрии, указывающее на тот факт, что экспериментальные данные находятся слева от медианы. Наиболее сильное отклонение наблюдается в группах облученных животных. В контрольных группах прослеживается стремление к симметрии. Однако в группе ВВ асимметрия близка к умеренной, а в группе ДВ отмечается минимальная асимметрия.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Средняя продолжительность жизни необлученных мышей, самок, аутбредных ICR (CD-1), содержащихся в конвенциональных условиях 814.9 сут (табл. 1) оказалась сопоставима с показателем у самок B6C3F1 мышей, содержащихся в SPF-условиях [15] 860.5 сут. Эти данные указывают на относительное эпидемическое благополучие в нашем виварии и на возможность сопоставления полученных результатов с литературными данными. Принципиальным отличием от условий содержания животных в указанной публикации [16] является использование нами в качестве питьевой воды дистиллированной воды, не содержащей хлора и его органических производных, а также других потенциально токсичных веществ. Тогда как в экспериментах [16] животные получали водопроводную воду, а в работах [15, 17] питьевая вода была специально хлорирована, 10 ppm.

Выбранная нами схема радиационного воздействия на мышей не была случайной. Эта доза в определенной мере имитировала дозу, допустимую для космонавтов за весь период трудовой деятельности — 1 Гр [18], с поправкой для мышей, как более радиорезистентного вида млекопитающих [19].

Воздействие  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  было начато после достижения половозрелости и продолжалось на протяжении длительного периода (230 сут), имитирующего период трудовой деятельности человека с напряженными условиями труда и высокими радиационными нагрузками. По основному радиобиологическому эффекту хронического радиационного воздействия (сокращению продолжительности жизни) избранная нами схема хорошо согласовалась с эффектом более длительного радиационного воздействия (400 сут) с меньшей мощностью дозы  $\gamma$ -излучения в существенно большей суммарной дозе 8.0 Гр [17]. Сокращение



**Рис. 2.** Скорость смертности самок мышей ICR (CD-1), облученных фракционно в суммарной дозе 1,65 Гр и необлученных (графики Гомперца): А — облученные (2) и необлученные (1), содержащиеся на водопроводной воде; Б — облученные (4) и необлученные (3), содержащиеся на дистиллированной воде; В — необлученные, содержащиеся на водопроводной (1) и дистиллированной (3) воде; Г — облученные, содержащиеся на водопроводной (2) и дистиллированной (4) воде.

**Fig. 2.** Death rate of female ICR (CD-1) mice fractionally irradiated at a total dose of 1,65 Gy and not irradiated (Gompertz plots): А — irradiated (2) and non-irradiated (1), kept on tap water; Б — irradiated (4) and non-irradiated (3), kept on distilled water; В — non-irradiated, kept on tap (1) and distilled (3) water; D — irradiated, kept on tap (2) and distilled (4) water.



средней продолжительности жизни облученных мышей в наших экспериментах при использовании в качестве питьевой воды из водопровода составило 162.6 сут, а в цитированной [17] работе, выполненной на самках мышей В6С3F1 содержащихся в SPF условиях, 119.6 и 176 сут при разных суммарных дозах хронического облучения [15]. В наших экспериментах с дистиллированной водой этот эффект снизился более чем в 3 раза. Разница между средней продолжительностью жизни облученных и необлученных мышей, содержащихся на дистиллированной воде, составила только 49.6 сут. Динамика выживаемости (рис. 1) и скорость гибели облученных мышей (рис. 2) в сравниваемых группах животных, содержащихся на водопроводной и дистиллированной воде были однотипны по конфигурации, но по обоим показателям группа животных, содержащихся на водопроводной воде, превосходила группу, потреблявшую ДВ.

Таким образом, совершенно очевидно, что содержание облученных мышей на водопроводной воде приводит к сокращению их продолжительности жизни и увеличивает скорость их гибели по сравнению с облученными в той же дозе и по той же схеме мышами, содержащимися на дистиллированной воде.

В чем причина полученных различий?

По нашим данным, содержание необлученных животных на водопроводной воде статистически незначимо сокращает их среднюю продолжительность жизни, но увеличивает их скорость смертности (табл. 1, рис. 2) в ранний период после радиационного воздействия, увеличивает коэффициент асимметрии индивидуальных значений средней продолжительности жизни (табл. 1) по сравнению с необлученными животными, содержащимися на дистиллированной воде. Все это указывает на определенные изменения в организме мышей, потреблявших водопроводную воду. Остается необоснованной причина этих проявлений. Это могут быть токсичные вещества, содержащиеся в водопроводной воде на уровне, не превышающем предельно допустимую концентрацию, или изменение метаболизма в организме мышей, получавших деминерализованную воду.

Первое предположение нам представляется наиболее вероятным. Известно мутагенное и генотоксическое действие хлорированной воды [20]. В эксперименте с хроническим облучением мышей, содержащихся на воде с добавлением минимального количества хлора — 10 ppm — [21] основной причиной ранней смертности были злокачественные лимфомы.

Значение хлора в питьевой воде в развитии рака мочевого пузыря отмечено у человека [22]. Гипохлорит натрия, используемый для дезинфекции водопроводной воды, обладает отчетливой мутагенностью как для микроорганизмов — *Salmonella typhimurium*, так и в культуре клеток — фибробласты китайского хомячка [23]. Второе предположение менее вероятно. В соответствии с рекомендациями ВОЗ [24], дистиллированная вода сама по себе пригодна для питья при условии обеспечения минералами за счет, в частности, продуктов питания. Использованный в экспериментах корм для грызунов является полноценным по содержанию минералов. Однако полностью исключить этот фактор на данном этапе нельзя.

Радиационное воздействие  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  в дозе 1.65 Гр мышей, содержащихся на дистиллированной воде, обусловило статистически незначимое небольшое снижение их продолжительности жизни (49,6 сут) по сравнению с необлученными животными, получавшими дистиллированную воду. Снижение продолжительности жизни необлученных мышей, содержащихся на водопроводной воде, также оказалось статистически незначимым по отношению к величине этого показателя у мышей, получивших дистиллированную воду — снижение на 16.6 сут. Комбинированное воздействие этих факторов — облучение и содержание на водопроводной воде — обусловило выраженное — на 179.2 сут — статистически значимое снижение продолжительности жизни. В данном случае имеет место потенцирование (синергизм) эффекта радиационного воздействия и содержания на водопроводной воде.

Данные, приведенные в этой статье, не позволяют детально обсуждать возможные молекулярные механизмы выявленного эффекта. Тем не менее, исходя из общепринятой концепции о важной роли радиационно-индуцированных радикалов в механизме повреждающего действия ионизирующей радиации, можно предположить, что при потреблении водопроводной воды в организм поступают продукты, в том числе хлор и его производные с выраженными окислительными свойствами, которые способны потенцировать эффект хронического радиационного воздействия. Известно [17], что N-Acetyl-L-cysteine (NAC), обладающий выраженными антиоксидантными свойствами при хроническом поступлении с питьевой водой в организм мышей в период длительного, в течение 400 сут,  $\gamma$ -облучения в суммарной дозе 8 Гр, обеспечивает статистически значимое на 59 сут увеличение средней продол-

жительности жизни. Нельзя исключить в данном случае способность НАС инактивировать окислительные свойства хлорированной питьевой воды, еще до ее поступления в организм мышей.

Учет качества питьевой воды, по нашему мнению, необходим как в радиобиологических экспериментах, так и в радиационно-эпидемиологических исследованиях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение средней продолжительности жизни мышей после длительного фракционированного воздействия  $\gamma$ -излучения  $^{60}\text{Co}$  достигается использованием в качестве питьевой дистиллированной воды взамен водопроводной. При этом более чем трехкратное уменьшение срока пострадиационного сокращения продолжительности жизни, а также снижение скорости гибели облученных животных. Соматические эффекты и уровень поведенческих показателей у мышей в проведенных экспериментах будут представлены в следующей статье.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим за техническую помощь сотрудников лаборатории радиационной биологии ОИЯИ Ю.С. Северюхина, К.Н. Ляхову, И.А. Колесникову, а также старшего научного сотрудника ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России канд. физ.-мат. наук Е.А. Анненкову за помощь при статистической обработке данных.

Работа выполнена в рамках базовой темы НИР РАН № 65.2 и НИР “Технология-3” (номер регистрации НИР в системе ЕГИСУ НИОКТР: 1230113001053).

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pierce D.A., Shimizu Y., Preston D.L. et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, part 1. Cancer: 1950–1990. *J. Radiat. Res.* 1996; 146, 1–27. PMID: 8677290.
- Katayama H., Matsuura M., Endo S. et al. Reassessment of the cancer mortality risk among Hiroshima atomic-bomb survivors using a new dosimetry system, ABS2000D, compared with ABS93D. *J. Radiat. Res.* 2002; 43, 53–64. <https://doi.org/10.1269/jrr.43.53>. PMID: 12056330
- Cardis E., Gilbert E.S., Carpenter L. et al. Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *J. Radiat. Res.* 1995; 142 (2): 117–32. PMID: 7724726.
- Аклеев А.В. Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча. Челябинск: Книга, 2012. 464 с. [Akleyev A.V. Chronic radiation syndrome among residents of the Techa River riverside villages. Chelyabinsk: Kniga, 2012. 464 p. (In Russ.)]
- Mole R. H. Shortening of life by chronic irradiation: The experimental facts. *Nature.* 1957; 180: 456–460.
- Storer J. B., Mitchell T. J., Fry R. J. M. Extrapolation of the relative risk of radiogenic neoplasms across mouse strains and to man. *J. Radiat. Res.* 1988; 114: 331–353.
- Fry R. J. M. Effects of low doses of radiation. *Health Phys.* 1996; 70: 823–827.
- Шафиркин А.В., Григорьев Ю.Г. Межпланетные и орбитальные космические полеты. Радиационный риск для космонавтов (радиобиологическое обоснование). М.: Экономика, 2009. 639 с. [Shafirkin A.V., Grigoryev Y.G. Interplanetary and orbital space flights. The radiation risk to astronauts (Radiobiological basis). М.: Economica, 2009. 639 p. (In Russ.)]
- Иванов А.А., Ушаков И.Б., Куликова Е.И. и др. Легкоизотопная вода — средство лечения острой лучевой болезни. *Авиакосм. и экол. медицина.* 2013. Т. 47. № 5. С. 40–44. [Ivanov A.A., Ushakov I.B., Kulikova E.I. et al. Light-Isotope Water as a Therapeutic Agent for Acute Radiation Disease. *Aerospace and Environmental Medicine.* 2013; 47(5):40–44. (In Russ.)].
- Laisue J.A., Altermatt H.J., Bally E., Gebbers J.O. Protection of mice from whole body gamma irradiation by deuteration of drinking water: hematologic findings. *Experim. Hematol.* 1987; 15(2): 177–180.
- Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group, Lyon, 12–19 June 1990. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1991/ Vol. 52. P. 45–399.
- National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chlorinated Water (CAS Nos. 7782-50-5 and 7681-52-9) and Chloraminated Water (CAS No. 10599-90-3) (Deionized and Charcoal-Filtered) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Drinking Water Studies). Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser. 1992. Vol. 392. P. 1–466.
- Kaplan E.L., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Association.* 1958; 53(282): 457–481. <https://doi.org/10.2307/2281868>
- Sacher G.A. On the statistical nature of mortality, with especial reference to chronic radiation mortality. *Radiology.* 1956; 67(2): 250–258. <https://doi.org/10.1148/67.2.250>

15. Tanaka S., Tanaka I.B. 3rd, Sasagawa S. et al. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates. *J. Radiat. Res.* 2003; 160 (3): 376–379. <https://doi.org/10.1667/RR3042>
16. Бычкова Т.М., Никитенко О.В., Утина Д.М., Иванов А.А. Влияние длительного фракционированного  $\gamma$ -облучения на продолжительность жизни мышей. *Авиакосм. и экол. медицина.* 2022. Т. 56. № 4. С. 77–82. [Bychkova T.M., Nikitenko O.V., Utina D.M., Ivanov A.A. Effect of long-term fractionated  $\gamma$ -irradiation on mice lifespan. *Aerospace and Environmental Medicine.* 2022; 56 (4):77–82. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2022-56-4-77-82>
17. Yamauchi K., Tsutsumi Y., Ichinohe K. et al. Effects of N-acetylcysteine on life shortening induced by chronic low dose-rate gamma-ray exposure in mice. *Int. J. Radiat. Res.* 2019;17(1):67–73. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijrr.17.1.67>
18. Санитарные правила и нормы. СанПиН 2.6.1.44-03-2004. Методические указания МУ 2.6.1.44-03-2004. Ограничение облучения космонавтов при околоземных космических полетах (ООКОКП-2004). М.: Федеральное управление “Медбиоэкстрем”, 2004. [Sanitary rules and norms. SanPiN 2.6.1.44-03-2004. Guidelines MU 2.6.1.44-03-2004. Limit exposure of astronauts in near-earth space flights (OOKOK-2004). Moscow: The Federal office “Medbioekstrem”, 2004. (In Russ.)]
19. Alpen E.L. Comparison of hematological responses and radiation recovery in several mammalian species. Effects of ionizing radiation on the hematopoietic tissue proceeding of a panel. Vienna, 1967, P. 103–110.
20. Rincón-Bedoya E., Velásquez N., Quijano J., Bravo-Linares C. Mutagenicity and genotoxicity of water treated for human consumption induced by chlorination by-products. *J. Environ. Health.* 2013;75(6):28–36.
21. Tanaka I.B. 3rd, Tanaka S., Ichinohe K. et al. Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays. *J. Radiat. Res.* 2007;167(4):417–37. <https://doi.org/10.1667/RR0728.1>
22. Cantor K.P., Hoover R., Hartge P. et al. Bladder cancer, drinking water source, and tap water consumption: a case-control study. *J. Nat. Cancer Institute.* 1987;79(6):1269–79.
23. Ishidate M. Jr., Sofuni T., Yoshikawa K. et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.* 1984;22(8):623–36. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(84\)90271-0](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90271-0)
24. WHO Library Cataloguing in Publication Data Guidelines for Drinking – water Quality. 4th Ed., WHO 2011; 584 p.

## Tap Water Shorts the Lifespan of Mice with Prolonged Exposure to Fractionated $\gamma$ -Radiation

O. V. Nikitenko<sup>1,2</sup>, T. M. Bychkova<sup>1,2</sup>, D. M. Utina<sup>3</sup>,  
V. N. Gaevsky<sup>3</sup>, I. B. Ushakov<sup>2</sup>, A. A. Ivanov<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific Center of the Russian Federation –  
Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency  
of Russia, Moscow, Russia

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

\*E-mail: dorozhkina88@mail.ru

Assessing the role of social factors in the formation of radioresistance in chronic exposure and finding ways to increase it are important for understanding the mechanisms of the damaging effects of radiation and developing practical methods for reducing radiation risk in professionals exposed to ionizing radiation and patients undergoing radiation therapy. In this work, we investigated the ability to influence the lifespan of animals exposed to  $\gamma$ -radiation fractionally for a long time by replacing drinking water from tap water to distilled water. Female ICR mice (CD-1) were exposed to total <sup>60</sup>Co  $\gamma$  radiation weekly in fractions for 33 weeks starting at 9 weeks of age. The dose of a single irradiation was 50 mGy, the average dose rate was 2 mGy/sec. The total radiation dose was 1.65 Gy. Control non-irradiated mice and irradiated animals were divided into 2 groups. The first received tap water, and the second received distilled water throughout the experiment. Non-irradiated animals kept on tap water showed a statistically insignificant (log-rank test,  $p = 0.483$ ) reduction in average life expectancy compared to mice kept on distilled water. In animals after exposure to <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -radiation, a statistically significant ( $p = 0.0013$ ) decrease in life expectancy was noted when kept on tap water and statistically insignificant ( $p = 0.1511$ ) when kept on distilled water. Tap water and irradiation showed a clear synergy with a combined effect on the body of mice, expressed in a more than threefold decrease in the period of post-radiation shortening of life expectancy. Distilled water reduced the rate of death of irradiated animals and modified the rate of death of non-irradiated animals. Our data demonstrate that the reduction in life expectancy of mice kept on tap water caused by long-term fractionated irradiation can be reduced when animals are kept on distilled water.

**Keywords:** fractionated long-term gamma irradiation, tap and distilled water, shortened lifespan, mouse model

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Никитенко Ольга Васильевна, ORCID 0000-0001-9011-4500.

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна” ФМБА России, Москва, Россия (123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д.23);

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия (123007 Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А).

dorozhkina88@mail.ru  
Nikitenko Olga Vasil'evna

The A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow (123098, Moscow, st. Marshala Novikova, 23);

Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific center of the Russian Federation — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow (123007 Russia, Moscow, Khoroshevskoe highway, 76 А)

Бычкова Таисия Михайловна, ORCID 0000-0003-2678-6964

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна” ФМБА России, Москва, Россия (123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д.23);

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия (123007 Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А).

taisiabichkova@mail.ru  
Bychkova Taisia Mikhailovna

The A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow (123098, Moscow, st. Marshala Novikova, 23);

Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific center of the Russian Federation — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow (123007 Russia, Moscow, Khoroshevskoe highway, 76 А)

Утина Дина Михайловна

Объединенный институт ядерных исследований (141980 г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6)  
din-din-86@mail.ru

Utina Dina Mikhailovna.

Joint Institute for Nuclear Research (141980 Dubna, Moscow region, Joliot-Curie St., 6)

Гаевский Виктор Николаевич

Объединенный институт ядерных исследований (141980 г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6)  
gaevskij2011@yandex.ru

Gaevsky Viktor Nikolaevich

Joint Institute for Nuclear Research (141980 Dubna, Moscow region, Joliot-Curie St., 6)

Ушаков Игорь Борисович, ORCID 0000-0002-0270-8622

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна” ФМБА России, Москва, Россия (123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д.23)

iushakov@fmbcfmba.ru  
Ushakov Igor Borisovich

The A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow (123098, Moscow, st. Marshala Novikova, 23)

Иванов Александр Александрович, ORCID 0000-0001-8403-8636

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна” ФМБА России, Москва, Россия (123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д.23);

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия (123007 Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А);

Объединенный институт ядерных исследований (141980 г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6 (ОИЯИ))

a1931192@mail.ru  
Ivanov Alexander Alexandrovich

The A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow (123098, Moscow, st. Marshala Novikova, 23);

Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific center of the Russian Federation — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow (123007 Russia, Moscow, Khoroshevskoe highway, 76 А);

Joint Institute for Nuclear Research (141980 Dubna, Moscow region, Joliot-Curie St., 6)

**Вклад авторов**

Вклад авторов: все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

УДК 539.163:631.4:58-009

## МИГРАЦИЯ ПЛУТОНИЯ, МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТОВ В СИСТЕМЕ “ПОЧВА–РАСТЕНИЕ” ПРИ РАЗНОЙ ВЛАЖНОСТИ ПОЧВЫ

© 2024 г. М. А. Эдомская<sup>1,\*</sup>, С. Н. Лукашенко<sup>1</sup>, А. А. Шупик<sup>1</sup>,  
Д. А. Желтов<sup>2</sup>, П. В. Харкин<sup>2</sup>, В. А. Макарова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии  
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт», Обнинск, Россия

<sup>2</sup>Институт ядерной физики, Алматы, Казахстан

\*E-mail: ma.edomsкая@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

В вегетационном опыте изучены процессы миграции плутония, микро- и макроэлементов в системе “почва–сельскохозяйственное растение” в зависимости от влажности почвы в диапазоне от 15 до 40% абсолютной влажности почвы. Анализ содержания плутония проводили методом  $\alpha$ -спектрометрии с предварительным радиохимическим выделением. Анализ элементного состава осуществляли методами ИСП-МС и ИСП-АЭС. В качестве тест-культуры использовали бобы (*Fabaceae*) сорт “Янтарные”. Полученные в ходе вегетационных опытов коэффициенты накопления плутония находятся в диапазоне  $5.3 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$ , при среднем значении  $5.4 \times 10^{-3}$  – для надземной части бобов и  $4.5 \times 10^{-2} - 2.7 \times 10^{-1}$ , при среднем  $1.6 \times 10^{-1}$  – для корней бобов. Определено, что характер распределения плутония, микро- и макроэлементов по вегетативным органам растений разный, коэффициент накопления плутония для надземной части растений ниже, чем для корневой. Установлено, что накопление плутония, микро- и макроэлементов в зависимости от увлажненности почв неодинаковы для отдельных органов бобов. Зависимость накопления плутония от влажности почвы существенно выше, чем для других рассматриваемых элементов. Для надземной части тест-культуры бобы с увеличением влажности почвы фиксируется снижение коэффициента накопления плутония до двух порядков. Наблюдается тенденция незначительного снижения коэффициентов накопления Fe, Mg, Mn, Cr, Mo, Ni, Co, Cu. Для корневой системы бобов четкой зависимости накопления рассматриваемых элементов от влажности почв не наблюдается.

**Ключевые слова:** плутоний, микроэлементы, макроэлементы, миграция, система “почва–растение”, коэффициент накопления, бобы

DOI: 10.31857/S0869803124020106, EDN: NAMRPD

Исследования по оценке дозовых нагрузок, выполненные на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварий на предприятиях ядерного энергетического цикла, показали, что во многих радиоэкологических ситуациях вклад внутреннего облучения населения за счет потребления содержащих радионуклиды продуктов питания в суммарную дозу сравним или даже выше вклада внешнего облучения [1].

В мировой практике исследований по изучению процессов перехода искусственных радионуклидов и тяжелых металлов (ТМ) в системе “почва–растение” известно достаточно много. И если в отношении тяжелых металлов сформировано определенное понимание их миграционной способности в системе “почва–растение”, то в отношении радионуклидов наблюдается недостаток в первичных

данных. Более того, в основном, исследования посвящены переходам таких “традиционных” изотопов, как  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ , и гораздо меньшее количество исследований посвящено переходам изотопов плутония.

В мировой практике для количественного описания параметров переноса элементов из почвы в растения используют коэффициенты накопления, рассчитанные как отношение содержания элементов в сухой биомассе растений к их содержанию в сухой почве.

Все значимые результаты мировых исследований по переходу элементов из почвы в растения были обобщены группой экспертов МАГАТЭ и представлены в специальных публикациях [2–4]. В данных публикациях отмечается, что средние значения коэффициента накопления ( $K_d$ ) для бобовых культур

составляют 0.0002–0.48 для Fe, 0.022–2.8 для Mn, 5.4 для Mo, 0.073–2.6 для Ni, 0.91 для Zn, 0.08–0.46 для Cd, 0.005–0.72 для Co, 0.00046–4.9 для Pb.

Большой объем исследований по миграции ТМ в системе “почва–растение” для бобовых культур был проведен во Всероссийском научно-исследовательском институте радиологии и агроэкологии [5]. Например, коэффициенты накопления цинка при выращивании кормовых бобов на дерново-подзолистой почве с содержанием Zn в почве 0–500 мг/кг составили 1.58–4.16, в то время как при содержании свинца в почве 0–1500 мг/кг  $K_n(\text{Pb})$  составили 6.9–24.9. Коэффициенты накопления меди бобовыми, выращенными на почвах с концентрацией Cu 0–500 мг/кг, колебались от 0.1 до 1.3.

Коэффициенты накопления плутония приведенные в публикациях МАГАТЭ отличаются высокой вариативностью значений до четырех порядков. Например, диапазон  $K_n$  плутония для зерна злаковых культур составляет  $2.0 \times 10^{-7}$ – $1.1 \times 10^{-3}$ , для кустарников –  $6.4 \times 10^{-5}$ – $6.6 \times 10^{-1}$ . Возможно, это связано с тем, что  $K_n(\text{Pu})$  представлены для объединенных групп различных видов растений, а также получены в различных почвенно-климатических условиях.

Значительный объем исследований накопления изотопов плутония дикорастущей растительностью произведен на территории 30 км зоны отчуждения и Полесского радиационно-экологического заповедника [6–10]. Например,  $K_n$  плутония для травянистой растительности территории подверженной чернобыльским выпадениям находится на уровне  $n \times 10^{-2}$ . Так для стеблей злаковых культур диапазон  $K_n$  составляет  $3.0 \times 10^{-3}$ – $4.1 \times 10^{-1}$ , для осоки –  $3.0 \times 10^{-3}$ – $1.4 \times 10^{-1}$ .

Обширные исследования были проведены по изучению накопления изотопов плутония дикорастущими и сельскохозяйственными растениями на территории Семипалатинского испытательного полигона (СИП) [1, 11, 12]. Исследования проводились в естественных условиях, на участках с высокими содержанием плутония (до  $n \times 10^4$  Бк/кг), на одном типе почвы в одной климатической зоне, что позволяет предположить, что систематическая погрешность при проведении данных исследований сведена к минимуму. Экспериментальные данные по  $K_n(\text{Pu})$  растительностью, полученные при исследованиях, проведенных на территории СИП выше обобщенных данных МАГАТЭ на 1–2 порядка для некоторых с/х культур. Например, среднее значение  $K_n$  надземной частью моркови по данным МАГАТЭ составляет  $2.2 \times 10^{-3}$ , в то время как для территории СИП –  $6.9 \times 10^{-2}$ , для корнеплода

моркови  $K_n$  составляет  $3.9 \times 10^{-4}$  и  $3.9 \times 10^{-2}$  соответственно. На три порядка выше значение  $K_n$  плодов баклажана, которые составили  $5.5 \times 10^{-2}$  для территории СИП и  $6.2 \times 10^{-5}$  по данным МАГАТЭ (данные представлены как плоды не листовых овощей). На два порядка отличаются и  $K_n$  для листовых овощей. Так, по данным, средний  $K_n$  составляет  $8.3 \times 10^{-5}$ , в то время как для листовой части капусты, выращенной на территории СИП данный коэффициент составляет  $1.2 \times 10^{-3}$ .

Такая высокая вариабельность коэффициентов накопления плутония делает актуальным исследование по определению механизмов, влияющих на миграционную способность и доступность его для растительности.

Одним из важнейших факторов внешней среды, от которого зависит химическое состояние органических и минеральных компонентов почв, является режим увлажнения. Развитие окислительно-восстановительных процессов и изменение кислотности почв в результате высушивания или избыточного увлажнения, оказывают значительное влияние на подвижность металлов, вызывая их осаждение, растворение, а также образование комплексных соединений различной прочности с органическим веществом, глинистыми минералами и другими почвенными компонентами. В наибольшей мере таким превращениям подвержены элементы с переменной валентностью.

Прогнозирование развития техногенной обстановки на сельскохозяйственных угодьях, а также разработка комплекса мероприятий по производству продукции с минимальным содержанием токсикантов базируются на знании особенностей миграции радионуклидов микро- и макроэлементов в агроландшафтах и оценке значимости факторов, влияющих на поведение загрязняющих веществ в системе “почва–растение”.

Цель настоящего исследования – изучить влияние увлажнения дерново-подзолистой почвы на накопление плутония, макро- и микроэлементов сельскохозяйственными растениями на примере бобов сорта “Янтарный” в условиях вегетационного опыта.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Подготовка почвы*

В качестве почвы использована дерново-подзолистая супесчаная окультуренная почва с внесенными удобрениями. Исходные физические и химические показатели почвы представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Основные характеристики дерново-подзолистой супесчаной почвы

Показатель	Величина показателя
Полная влагоемкость, %	36.0 ± 1.0
$pH_{KCl}$	5.05 ± 0.01
$pH_{H_2O}$	6.04 ± 0.01
Гумус, %	1.67 ± 0.03
Физическая глина (<0.01 мм)	18.4
Илистая фракции (<2 мкм), %	8.8
Нг, мг-экв/100 г почвы	1.89 ± 0.02
Сумма обменных оснований, мг-экв/100 г почвы	5.3 ± 0.1
Обменный $K_2O$ , мг/кг (по Масловой)	77.7 ± 1.3
Подвижный $P_2O_5$ , мг/кг (по Кирсанову)	127 ± 2

Отобранную почву высушивали до воздушно-сухого состояния и просеивали через сито с диаметром отверстий 3 мм.

Просеянную почву массой 30 кг помещали в пластиковую емкость объемом 50 литров. Добавляли водный раствор содержащий элементы питания N,  $P_2O_5$  и  $K_2O$  из расчета добавления 200, 100, 100 мг/кг воздушно-сухой почвы соответственно. При тщательном перемешивании вносили 1 л водного раствора  $^{239}Pu$  концентрацией 11.25 Бк/см<sup>3</sup>. Общая концентрация плутония в почве составляла 375 Бк/кг. Почву инкубировали в течение 45 сут при периодическом перемешивании.

После инкубации почвы измеряли концентрацию  $^{239}Pu$ . Результаты анализа почвы представлены в табл. 2.

Анализ образцов почвы показывает, что расхождение между расчетным и измеренным содержанием  $^{239}Pu$  в почве не превышает 8%, при среднем расхождении 2%.

#### Проведение вегетационного опыта

Для выращивания бобов использовали сосуды диаметром 22 см и высотой 20 см.

Набивку сосудов осуществляли согласно стандартным методикам проведения вегетационных опытов в агрохимии [13]. На дно сосуда помещали дренаж в виде пластиковых гранул диаметром 5 мм, поверх дренажа укладывали инертный материал и ставилась дренажная трубка. На весах поверх

дренажа насыпалась сухая почва ~3.5 кг с содержанием плутония 375 Бк/кг. В каждый сосуд на весах добавляли расчетное количество воды до соответствующей влажности почвы. Чтобы уменьшить испарение влаги, предотвратить образование почвенной корочки и уменьшить нагрев почвы солнцем, сверху насыпали пластиковые гранулы диаметром 5 мм светло-бежевого цвета. Сосуды с почвой выдерживались 10 дней с ежедневным доливом воды на весах до расчетной массы для достижения равномерного увлажнения почвы в сосуде.

Посев культур проводился пророщенными семенами на глубину 0.5 см. Бобы выращивали в закрытой теплице. Условия проведения вегетационного опыта контролировались с помощью регистратора температуры и влажности Elitech GSP-6 с автоматической записью каждый час. Вегетационный период составлял 38 дней. Диапазон температурного режима проведения вегетационных опытов составлял +20–+28°C, при среднем значении +23°C, влажности воздуха – 45–78%, при среднем значении 69%.

Во время вегетационного периода ежедневно проводился контроль массы сосудов с растениями и их долив водой до соответствующей влажности в каждом сосуде. Увеличением массы сосудов за счет прироста массы растений пренебрегали.

Для установления потребления влаги растениями для каждой точки дублировался сосуд с “черным паром” (рис. 1). Расчет потребляемой влаги растениями рассчитывали, как разницу между потерей массы в сосудах с растениями и “черным паром” одинаковой влажности. Поскольку масса растений в сосудах отличалась, проведен перерасчет потребления влаги к единице сухой массы растения. Результаты расчета потребления растениями влаги представлено на рис. 2.

**Таблица 2.** Результаты контрольного анализа содержания  $^{239}Pu$  в подготовленной почве**Table 2.** Results of the control analysis of  $^{239}Pu$  content in prepared soil

Почва	Концентрация $^{239}Pu$ , Бк/кг		Разница, %
	расчетное количество	полученное в ходе анализа	
Дерново-подзолистая супесчаная	375	343 ± 48	8%
		386 ± 54	3%
		368 ± 52	2%
		Среднее – 366	2%

*Подготовка проб*

По окончании вегетационного периода надземную часть бобов срезали. Отобранные образцы растений сразу после отбора промывали водопроводной водой и ополаскивали дистиллированной водой.

Почву с корневой системой переворачивали на сито диаметром 3 мм, почву отсеивали, с поверхности сита проводили отбор корневой части. Образцы корней вначале промывали на сите водопроводной водой до полного осветления воды и отсутствия видимых частиц минеральной составляющей почвы. Далее корни отмывались под проточной водой при постоянном потирании поверхности пальцами рук с визуальным контролем до полного отсутствия частиц почвы в воде. Отмытые корни опускали в емкость с дистиллированной

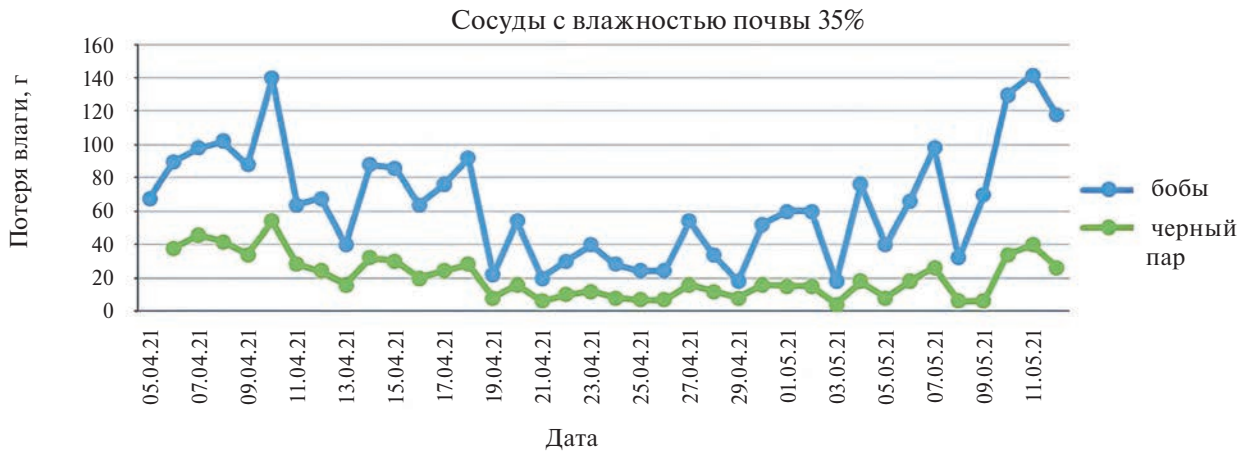
водой. Воду с корнями перемешивали в течение ~1 мин, визуально контролируя отсутствие почвенных частиц на дне емкости. При обнаружении почвенных частиц проводили дополнительную отмывку корней.

Образцы надземной и корневой частей рассматриваемых просушивали в сушильном шкафу при температуре 75°C до постоянного веса в течение 10–20 ч.

*Анализ проб*

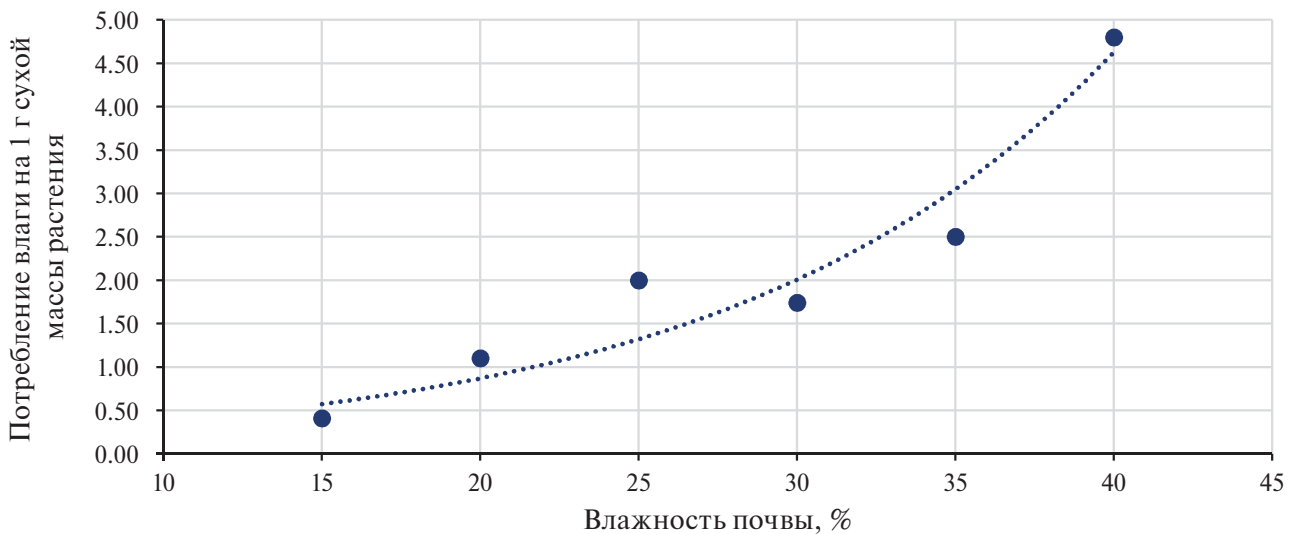
*Анализ содержания плутония*

Анализ содержания  $^{239+240}\text{Pu}$  в образцах проводили методом, описанном в [14]. Сухие образцы почвы и растений помещали в керамические тигли, вносили  $^{242}\text{Pu}$  в качестве трассера и проводили отжиг в муфельной печи при температуре 500°C в течение 7–8 ч. Озоленную пробу количественно переносили



**Рис. 1** Пример контроля потребления влаги бобами, выращенными при влажности почвы 35%.

**Fig. 1.** Example of monitoring moisture consumption of beans grown at 35% soil moisture.



**Рис. 2.** Среднее потребление влаги растениями в течение вегетационного периода.

**Fig. 2.** Average moisture consumption by plants during the growing season.



в тefлоновый стакан и растворяли смесью концентрированных HF, HNO<sub>3</sub> и HCl кислот до полного растворения с получением 7.5 моль/л HNO<sub>3</sub> раствора объемом 50 см<sup>3</sup>.

Из полученного после разложения раствора отбирали 3 см<sup>3</sup> для анализа количественного определения микро- и макроэлементов методами масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС).

В оставшийся раствор вносили 0.2–0.3 г NaNO<sub>2</sub> для стабилизации плутония в состоянии Pu<sup>4+</sup>. Радиохимическое выделение плутония проводилось методом ионообменной хроматографии на анионите АВ-17х8. Элюирование изотопов плутония проводили 5% раствором гидроксиламина солянокислого. Из полученного элюента методом соосаждения со фторидом лантана с последующей фильтрацией на мембране из полиэфирсульфона с максимальным размером пор 0.1 мкм получали спектрометрические источники плутония.

Измерение удельной активности альфа-излучающих изотопов плутония в подготовленном источнике проводилось α-спектрометрическим методом в α-спектрометрах Alpha Duo, ORTEC в течение 24 ч. Расчет активности изотопов плутония (<sup>239</sup>Pu и <sup>240</sup>Pu в сумме) выполнялся из соотношения регистрируемых импульсов, исходя из известной активности предварительно введенной в пробу изотопной метки <sup>242</sup>Pu.

#### *Анализ микро- и макроэлементов*

Элементный анализ разложенных образцов почв и растительности выполнен методами масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП), на квадрупольном масс-спектрометре ELAN-9000 (PerkinElmer SCIEX) и оптико-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ОЭС-ИСП) на оптико-эмиссионном спектрометре двойного обзора OPTIMA-8000DV (Perkin Elmer Inc.).

На обоих инструментах использовали штатный поперечно-поточный распылитель с ритоновой распылительной камерой и типичные операционные параметры [15–17]. Для анализа Cd, Co, Cu, Pb использовали метод МС-ИСП, для Fe, Mg, Mn, Cr, Mo, Ni, Zn – ОЭС-ИСП.

Поскольку навески и концентрации элементов в образцах заметно варьируются, образцы разбавляли деионизованной водой (≤0.2 мкS). Коэффициенты разбавления составили от 1 до 7.

Для коррекции инструментального дрейфа во все измеряемые пробы и градуировочные растворы

ввели внутренние стандарты <sup>103</sup>Rh 5 мкг/л (для МС-ИСП) и Sc 0.25 мг/л (для ОЭС-ИСП). Для приготовления градуировочных растворов использованы стандартные образцы (СО) состава металлов производства Perkin Elmer (США): N9300235 (10.0 мкг/мл Mo), N9300233 (10.0 мкг/мл As, Cd, Co, Cu, Pb, Fe, Mg, Mn, Cr, Ni, V, Zn). Приемлемость градуировочной характеристики определена по критерию  $R2 \geq 0.9992$ , где R2 – величина достоверности аппроксимации линейной функции.

#### *Обработка данных*

Аналитическая обработка данных проводилась в программном комплексе Microsoft Excel 2019. Средние величины рассчитывались как среднее арифметическое. Погрешность представлена ошибкой среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа содержания рассматриваемых элементов в почве, надземной и корневой части бобов представлены в табл. 3.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов анализа проведен расчет коэффициентов накопления плутония, макро- и микроэлементов в образцах растений. Рассчитанные K<sub>n</sub> представлены в табл. 4. Средние значения получены как среднее арифметическое.

#### *Коэффициенты накопления плутония и сопутствующих элементов вегетативными органами*

Полученные результаты существенно уточняют данные МАГАТЭ. Например, в публикации [2] дана оценка поглощения железа семенами и стручками бобовых культур, для которых диапазон K<sub>n</sub> составляет 0.0002–0.14. Для надземной части бобовых культур, оценка накопления железа отсутствует. Полученное значение коэффициента накопления молибдена, равное 1.5, дополняет представленное значение K<sub>n</sub> в публикациях МАГАТЭ, равное 5.4, которое было оценено по одному источнику.

Полученный в настоящей исследовании диапазон K<sub>n</sub> (Zn) равный 0.9–2.0 со средним значением 1.4 хорошо согласуется с представленными коэффициентами накопления в публикациях МАГАТЭ [2–4] и в работах ВНИИРАЭ [5], имеющих диапазоны в 0.25–13 при среднем значении 0.9 и 0.22–4.16 при среднем 1.5, соответственно.

Диапазон накопления меди в 0.1–1.3 со средним значением 0.5 дополняет представленное значение

$K_n$  в публикациях МАГАТЭ, полученное по 1 источнику и составляющее 0.8. По данным ВНИИРАЭ [5], диапазон  $K_n$  мели оценивается в 0.01-1.4, со средним значением 0.8.

Полученный диапазон значений  $K_n$  для свинца, равный 0.0094–0.038 при среднем значении 0.02 входит в представленный диапазон значений  $K_n(Pb)$

в публикациях МАГАТЭ в 0.00046–4.9 [2–4], и ниже полученных во ВНИИРАЭ данных, составляющих диапазон от 0,4 до 24,9 при среднем значении 13 [5]. Возможно это связано с тем, что  $K_n(Pb)$  полученные в настоящем исследовании рассчитывались для бобов, выращенных на фоновых концентрациях ТМ в почвах. В то время как в обобщенных

**Таблица 3.** Содержание плутония, макро- и микроэлементов в почве, надземной и корневой части бобов сорта «Янтарные»  
**Table 3.** Content of plutonium, macro- and microelements in the soil, above-ground and root parts of beans of the “Amber” variety

Вид	Орган	Влажность почвы	Содержание											
			Fe	Mg	Mn	Cr	Mo	Ni	Zn	Cu	Co	Cd	Pb	Pu
			мг/кг								мкг/кг			Бк/кг
Бобы	Надземная часть	15	26 ± 3	550 ± 61	190 ± 21	3.1 ± 0.3	0.89 ± 0.1	2.0 ± 0.3	11 ± 1	1.3 ± 0.2	110 ± 22	6.6 ± 2.0	59 ± 15	3.6 ± 1.0
		20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5.2 ± 2.0
		25	33 ± 4	600 ± 66	170 ± 19	1.7 ± 0.2	0.53 ± 0.06	0.96 ± 0.1	16 ± 2	0.70 ± 0.08	110 ± 22	4.1 ± 1.0	69 ± 17	1.9 ± 0.60
		30	26 ± 3	490 ± 54	120 ± 13	0.94 ± 0.1	0.43 ± 0.05	0.55 ± 0.07	20 ± 2	0.51 ± 0.06	110 ± 22	14 ± 4	120 ± 30	0.45 ± 0.10
		35	13 ± 2	430 ± 47	90 ± 9	0.84 ± 0.09	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.06	16 ± 2	0.37 ± 0.04	71 ± 14	8.4 ± 3.0	48 ± 12	0.31 ± 0.09
		40	9.4 ± 1	240 ± 26	45 ± 5	0.95 ± 0.1	0.36 ± 0.04	0.57 ± 0.07	8.9 ± 1.0	0.44 ± 0.05	30 ± 6	3.3 ± 1.0	30 ± 8	0.19 ± 0.06
	Корни	15	580 ± 64	1300 ± 140	290 ± 32	7.7 ± 0.8	2.1 ± 0.2	4.5 ± 0.6	21 ± 2	1.7 ± 0.2	990 ± 200	110 ± 33	750 ± 190	74 ± 20
		20	420 ± 46	1400 ± 150	350 ± 39	8.8 ± 1	2.6 ± 0.3	5.1 ± 0.7	42 ± 5	1.7 ± 0.2	1000 ± 200	200 ± 60	930 ± 230	68 ± 20
		25	400 ± 44	1700 ± 190	360 ± 40	9.2 ± 1	1.8 ± 0.2	5.0 ± 0.7	33 ± 4	1.4 ± 0.2	890 ± 180	180 ± 54	460 ± 120	59 ± 20
		30	460 ± 51	1100 ± 120	360 ± 40	4.9 ± 0.5	1.1 ± 0.1	2.5 ± 0.3	23 ± 3	1.2 ± 0.1	810 ± 160	190 ± 57	550 ± 140	39 ± 10
		35	350 ± 39	1100 ± 120	350 ± 39	4.7 ± 0.5	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.3	28 ± 3	1.4 ± 0.2	620 ± 120	210 ± 63	490 ± 120	16 ± 5
		40	150 ± 17	1400 ± 150	240 ± 26	7.8 ± 0.9	3.0 ± 0.3	4.5 ± 0.6	43 ± 5	1.0 ± 0.1	410 ± 82	110 ± 33	290 ± 73	96 ± 30
Почва	–	–	220 ± 24	730 ± 80	37 ± 4	12 ± 1	36 ± 4	6.2 ± 0.8	10 ± 1	2.3 ± 0.3	1100 ± 220	94 ± 28	3200 ± 800	375 ± 52

данных ВНИИРАЭ  $K_n$  свинца представлены для бобовых, выращенных на почвах с разной концентрацией свинца в почве, в том числе и с высокой.

Коэффициенты накопления плутония, полученные в ходе настоящей работы сопоставимы с  $K_n$ , представленными в литературных источниках. При этом для надземной части бобовых наблюдаются более высокие значения коэффициентов накопления плутония, чем значения  $K_n$ , представленные в публикациях МАГАТЭ. Так в настоящем исследовании среднее значение  $K_n$  надземной части бобов составило  $5.4 \times 10^{-3}$ , что на порядок выше данных МАГАТЭ ( $5.6 \times 10^{-4}$ ) [2–4] и на порядок ниже для дикорастущих бобовых культур территории чернобыльских выпадений ( $3.16 \times 10^{-2}$ ) [6–10].

Характер распределения плутония в органах растений указывает, что наибольшие концентрации

$^{239+240}\text{Pu}$  наблюдаются в корнях, превышающие концентрации в надземной части до нескольких порядков. Величина превышения коэффициента накопления, рассчитанная как отношение  $K_n$  корнями к  $K_n$  для надземной части представлена на рис. 3.

Разные виды растений накапливают в надземной части и корневой системе разные количества элементов [5, 18]. В литературных данных сведения о распределении ТМ по органам растений неоднозначны. В настоящей работе фиксируется превышение коэффициентов накопления рассматриваемых элементов в корневой части тест-культуры бобы (рис. 3).

Высокую разницу в накоплении плутония разными органами растений, достигающую двух порядков показывают результаты исследований миграции

**Таблица 4.** Коэффициенты накопления плутония, микро- и макроэлементов вегетативными органами бобов сорта “Янтарные”

**Table 4.** Transfer factors of plutonium, micro- and macroelements by the vegetative organs of beans of the “Amber” variety

Орган	Влажность почвы	Fe	Mg	Mn	Cr	Mo	Ni	Zn	Cu	Co	Cd	Pb	Pu
		Коэффициент накопления											
		$10^{-1}$	$10^{-1}$	100	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	100	$10^{-1}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
Надземная часть	15	$1.2 \pm 0.1$	$7.5 \pm 0.8$	$5.1 \pm 0.6$	$2.6 \pm 3$	$2.5 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.1$	$5.7 \pm 0.7$	$1.0 \pm 0.2$	$7.0 \pm 2.0$	$1.8 \pm 0.5$	$10 \pm 2$
	20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	$15 \pm 3$
	25	$1.5 \pm 0.2$	$8.2 \pm 0.9$	$4.6 \pm 0.5$	$1.4 \pm 2$	$1.5 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.2$	$4.4 \pm 1.0$	$2.2 \pm 0.6$	$5.3 \pm 1.3$
	30	$1.2 \pm 0.1$	$6.7 \pm 0.7$	$3.2 \pm 0.4$	$0.78 \pm 0.09$	$1.2 \pm 0.1$	$0.89 \pm 0.10$	$2.0 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.2$	$15 \pm 5$	$3.8 \pm 1.0$	$1.3 \pm 0.4$
	35	$0.59 \pm 0.06$	$5.9 \pm 0.6$	$2.4 \pm 0.3$	$0.70 \pm 0.08$	$1.2 \pm 0.1$	$0.78 \pm 0.10$	$1.6 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.2$	$0.65 \pm 0.10$	$8.9 \pm 3.0$	$1.5 \pm 0.4$	$0.87 \pm 0.26$
	40	$0.43 \pm 0.05$	$3.3 \pm 0.4$	$1.2 \pm 0.1$	$0.80 \pm 0.09$	$1.0 \pm 0.1$	$0.92 \pm 0.10$	$0.89 \pm 0.10$	$1.9 \pm 0.2$	$0.27 \pm 0.05$	$3.5 \pm 1.0$	$0.94 \pm 0.20$	$0.53 \pm 0.19$
	Среднее	0.98	6.3	3.3	1.3	1.5	1.5	1.4	2.9	0.78	7.8	2.0	5.5
Корни	15	$26 \pm 3$	$18 \pm 2$	$7.8 \pm 0.9$	$6.4 \pm 0.7$	$5.8 \pm 0.6$	$7.3 \pm 0.9$	$2.1 \pm 0.2$	$7.4 \pm 0.9$	$9.0 \pm 2.0$	$120 \pm 40$	$23 \pm 6$	$210 \pm 60$
	20	$19 \pm 2$	$19 \pm 2$	$9.5 \pm 1.0$	$7.3 \pm 0.8$	$7.2 \pm 0.8$	$8.2 \pm 1.0$	$4.2 \pm 0.5$	$7.4 \pm 0.9$	$9.1 \pm 2.0$	$210 \pm 60$	$29 \pm 7$	$190 \pm 60$
	25	$18 \pm 2$	$23 \pm 3$	$9.7 \pm 1.0$	$7.7 \pm 0.8$	$5.0 \pm 0.6$	$8.1 \pm 1.0$	$3.3 \pm 0.4$	$6.1 \pm 0.7$	$8.1 \pm 2.0$	$190 \pm 60$	$14 \pm 4$	$170 \pm 50$
	30	$21 \pm 2$	$15 \pm 2$	$9.7 \pm 1.0$	$4.1 \pm 0.5$	$3.1 \pm 0.3$	$4.0 \pm 0.5$	$2.3 \pm 0.3$	$5.2 \pm 0.6$	$7.4 \pm 1.0$	$200 \pm 60$	$7 \pm 4$	$110 \pm 30$
	35	$16 \pm 2$	$15 \pm 2$	$9.5 \pm 1.0$	$3.9 \pm 0.4$	$5.0 \pm 0.6$	$4.0 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.3$	$6.1 \pm 0.7$	$5.6 \pm 1.0$	$220 \pm 70$	$15 \pm 4$	$45 \pm 13$
	40	$6.8 \pm 0.7$	$19 \pm 2$	$6.5 \pm 0.7$	$6.5 \pm 0.7$	$8.3 \pm 0.9$	$7.3 \pm 0.9$	$4.3 \pm 0.5$	$4.3 \pm 0.5$	$3.7 \pm 0.7$	$120 \pm 40$	$9.1 \pm 2.0$	$270 \pm 80$
	Среднее	18	18	8.8	6.0	5.7	6.5	3.2	6.1	7.2	180	18	170

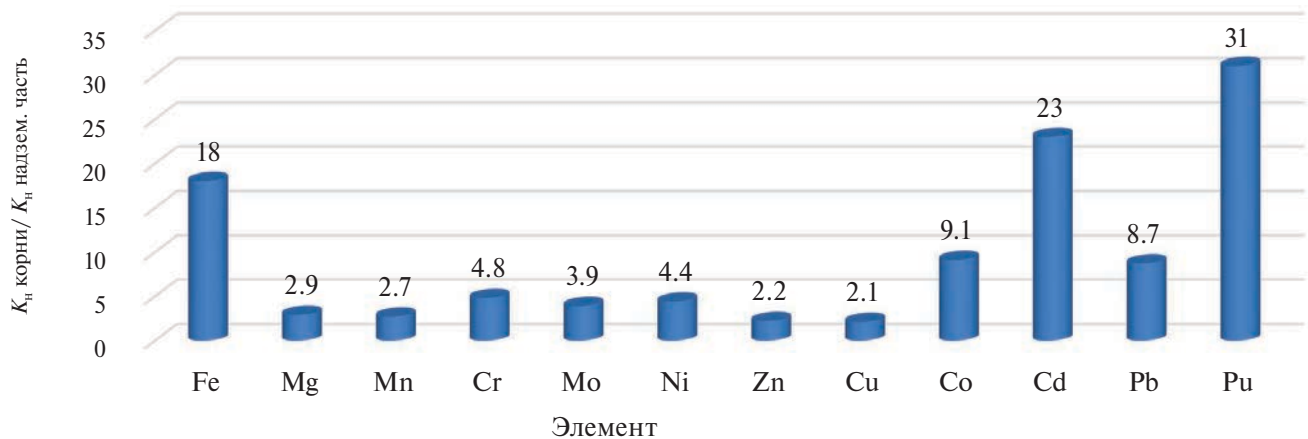


Рис. 3. Величина превышения коэффициента накопления корневой системой по отношению к надземной части.

Fig. 3. The amount of excess of the transfer factor by the root system in relation to the above-ground part.

плутония в системе “почва–растение”, проведенных на территории СИП. Например, для томатов  $K_n$  для листьев и стеблей по данным [19] составляет  $4.8 \times 10^{-3}$  и  $1.7 \times 10^{-3}$  соответственно, в то время как для корневой части этот коэффициент оценивается в  $2.9 \times 10^{-1}$ . Однако для некоторых культур не наблюдается более высоких концентраций плутония в корневой системе. Так для перца наибольший  $K_n$  фиксируется в листьях  $1.1 K_n \times 10^{-2}$ , а для стеблей и корней он составляет  $1.8 K_n \times 10^{-3}$  и  $9.0 \times 10^{-3}$ .

В целом данные литературных источников свидетельствуют о превышении коэффициентов накопления плутония корневой системой в сравнении с надземной частью растений.

#### *Зависимость $K_n$ от влажности почвы*

Зависимость коэффициентов накопления, полученных в ходе вегетационных опытов, от влажности почв представлена на рис. 4. Для сопоставления надземной и корневой частей бобов данные представлены в логарифмической шкале по оси ординат.

Анализ полученных в ходе вегетационных экспериментов  $K_n$  показывает, что особенности накопления плутония в зависимости от увлажненности почв неодинаковы для вегетативных органов бобов.

Из диаграммы 4 видно, что для надземной части бобов значение коэффициента накопления плутония с увеличением влажности почвы снижается. Так при абсолютной влажности почвы 15%  $K_n$  составил  $1.0 \times 10^{-2}$ , что на два порядка выше, чем  $K_n$  при 40% влажности —  $5.3 \times 10^{-4}$ .

Для большинства микро- и макроэлементов прослеживается тенденция снижения  $K_n$  от влажности почв для надземной части растений. В то же

время не наблюдается какой-либо зависимости в накоплении Zn, Cd и Pb надземной частью бобов.

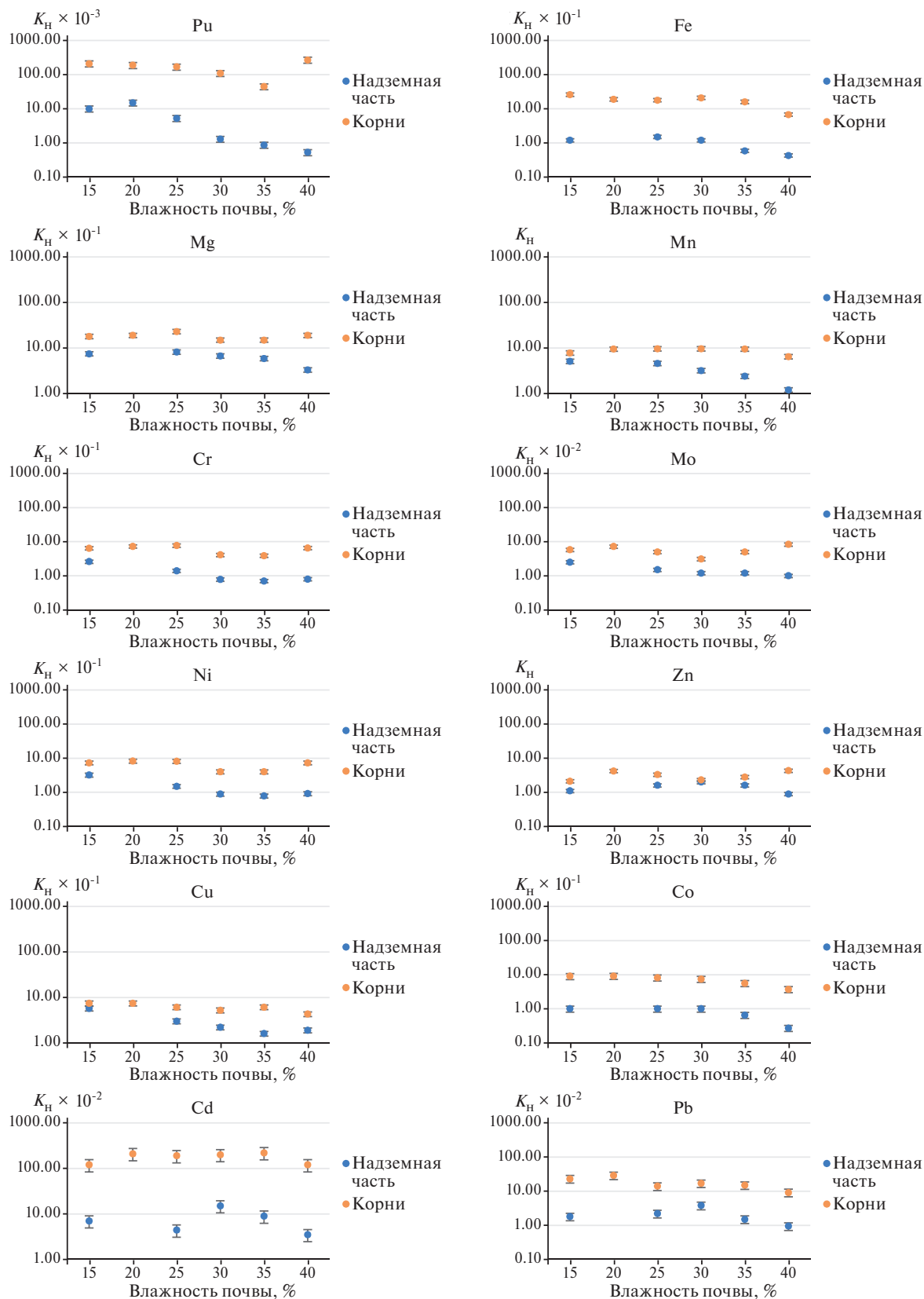
Для корневой части бобов не наблюдается однозначной зависимости в накоплении рассматриваемых элементов. Например, при абсолютной влажности почвы 15%  $K_n$  плутония составил  $2.1 \times 10^{-1}$ , а при 40% влажности —  $2.7 \times 10^{-1}$ .

На рис. 5 представлены количественные показатели изменчивости  $K_n$  (Pu), рассчитанной как отношение максимального значения  $K_n$  к минимальному.

Данные диаграммы 5 свидетельствуют, что в целом изменчивость коэффициентов накопления рассматриваемых элементов выше для надземной части бобов. При этом зависимость накопления плутония от влажности почвы существенно выше, чем для других рассматриваемых элементов.

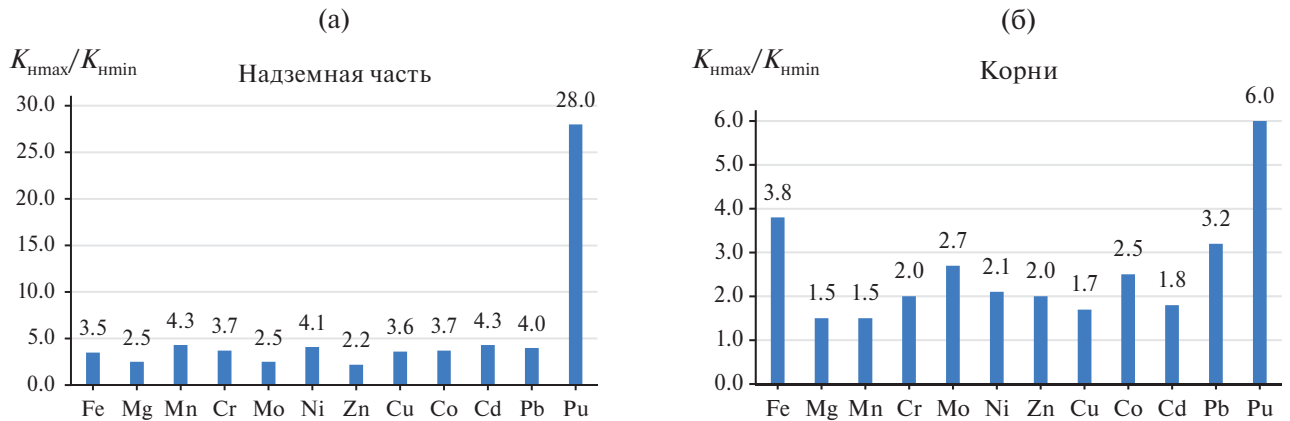
Изменение водного режима почвы приводит и к изменению окислительно-восстановительного потенциала почвы (ОВП). От величины ОВП зависит переход в раствор компонентов некоторых окислительно-восстановительных систем почвы. Например, ОВП ниже 200 мВ соответствуют редковосстановительным условиям, в которых протекают процессы преобразования и возникают восстановленные формы соединений железа и марганца, образуются сульфиты и нитриты. Накопление последних токсически действует на большинство культурных растений.

Влияние ОВП выражается в превращении минеральных веществ и прежде всего соединений элементов переменной валентности (азота, фосфора, серы, железа, марганца и др.). Так, при развитии контрастного окислительно-восстановительного режима в пахотных горизонтах почвы происходит накопление не силикатных подвижных соединений



**Рис. 4.** Зависимость коэффициентов накопления плутония, микро- и макроэлементов в системе “почва—сельскохозяйственное растение” от влажности почв.

**Fig. 4.** Dependence of the transfer factors of plutonium, micro- and macroelements in the “soil–crop plant” system on soil moisture.



**Рис. 5.** Изменчивость коэффициента накопления элементов, рассчитанная как отношение максимального значения к минимальному.

**Fig. 5.** Variability of the element transfer.

гидроксидов железа, которые связывают фосфор почвы и удобрений в трудноусвояемые растениями формы.

Другими факторами, влияющими на процесс миграции питательных веществ в системе “почва—растение”, являются процессы изменения в корнях растений при разном увлажнении почвы. Например, в условиях постоянной засухи стенки паренхимы корней становятся толще из-за усиления синтеза суберина, что замедляет отток поглощенных ионов в проводящие ткани и косвенно влияет на поглощение растениями новых ионов. С другой стороны, при избытке воды нарушается аэрация почвы. При этом недостаток кислорода влияет на дыхание корней, что приводит к нарушению поглощения солей. Кроме того, в условиях затопления корни плохо ветвятся и у них образуется мало корневых волосков, что также приводит к нарушению питания растений.

Длительное время транспирационный ток считался одним из обязательных условий поступления веществ из почвы в корень, а затем в надземные органы. Однако более поздние опыты показали, что количество поступивших в растение веществ непропорционально количеству прошедшей через него воды. Таким образом, существует несколько типов питания растений, независимых друг от друга с существенно различающимися механизмами [18].

Следует отметить, что экспериментальные данные потребления воды растениями (рис. 2) показывают увеличение транспирации с увеличением влажности почвы. При этом не наблюдается прямая зависимость в накоплении рассматриваемых элементов бобами. Следовательно, транспирационный ток не является определяющим путем поступления рассматриваемых элементов. Вероятнее всего перенос рассматриваемых

микро- и макроэлементов, а также плутония осуществляется другими методами питания, например, с использованием мембранных транспортных белков или в процессе эндоцитоза и экзоцитоза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе вегетационных экспериментов установлено, что накопление плутония, микро- и макроэлементов в зависимости от увлажненности почв неодинаково для отдельных органов бобовых.

Зависимость накопления плутония от влажности почвы существенно выше, чем для других рассматриваемых элементов. С увеличением влажности почвы наблюдается снижение коэффициента накопления плутония для надземной части бобов до двух порядков.

Для Fe, Mg, Mn, Cr, Mo, Ni, Co, Cu наблюдается тенденция к незначительному снижению коэффициентов накопления надземной частью бобов. Для Zn, Cd и Pb не выявлено зависимости накопления надземной частью бобов от влажности почвы.

Для корневой части бобовых зависимости коэффициентов накопления рассматриваемых элементов от влажности почв не наблюдается.

Таким образом, широкий диапазон коэффициентов накопления плутония, представленных в литературных данных, можно в значительной степени объяснить условиями произрастания растений и, в частности, влажностью почв.

Работа выполнена в рамках государственного задания 5ф6.4 “Создание научных основ мониторинга радиоактивно загрязненных территорий и разработка технологий возврата земель, подвергшихся радиоактивному воздействию, в сельскохозяйственный оборот”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы радиоэкологии Казахстана. Вып. 3. Сб. трудов Института радиационной безопасности и экологии за 2011 г. Под рук. Лукашенко С.Н. Павлодар: Дом печати, 2011;3(2):396. [Topical issues of radioecology in Kazakhstan. Ed. by S.N. Lukashenko. Pavlodar: Dom pechati, 2011;3(2):396. ISBN: 978-601-7112-38-7. (In Russ.)].
2. Balonov M. et al. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in terrestrial and freshwater environments. Technical Reports Series No. 472. IAEA, 2010.
3. Barnett C. L., et al. Quantification of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments for Radiological Assessments. IAEA-TECDOC-1616. IAEA, 2009.
4. Beresford N. A., Howard B.J. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer to wildlife. Technical Reports Series No. 479. IAEA, 2014.
5. Тяжелые металлы в агроценозах: миграция, действие, нормирование / Под ред. чл.-корр. РАН Н.И. Санжаровой, к.б.н. П.Н. Цыгвинцева. Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2019. 398 с. [Heavy metals in agrocenoses: migration, effect, regulation / Ed. by N.I. Sanzharova, P.N. Tsygvintsev. Obninsk: RIRAE, 2019. 398 p. (In Russ.)].
6. Спиров Р.К., Никитин А.Н., Чешик И.А., Король Р.А. Аккумуляция трансурановых элементов надземными и подземными органами сосудистых растений. Докл. Национальной академии наук Беларуси. 2017;61(2);51–57. [Spirov R.K., Nikitin A.N., Cheshik I.A., Korol R.A. Accumulation of transuranium elements by underground and aboveground organs of tracheophytes. *Doklady Natsional'noj Akademii Nauk Belarusi*. 2017;61(2):51–57. (In Russ.)].
7. Тагай С.А., Дударева Н.В., Нилова Е.К. Параметры перехода  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{239+240}\text{Pu}$  в сельскохозяйственные культуры. Современные проблемы радиобиологии – 2021: Мат. междунар. научн. конф., Гомель, 23–24 сентября 2021 г. Минск: Информационно-вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь. 2021. С. 166–169. [Tagay S.A. Dudareva N.V., Nilova E.K. Parameters of the transition of  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{239+240}\text{Pu}$  into agricultural crops. Modern problems of radiobiology – 2021: Proceedings of the international scientific conference, Gomel, September 23–24, 2021. Minsk: Information and Computing Center of the Ministry of Finance of the Republic of Belarus, 2021. 166–169. (In Russ.)].
8. Шуранкова О.А., В.П. Кудряшов. Поступление трансурановых элементов ( $^{239+240}\text{Pu}$ ,  $^{241}\text{Am}$ ) Чернобыльского происхождения в луговую растительность. *Пробл. здоровья и экологии*. 2006;1(7):67–71. [Shurankova O.A., Kudrjashov V.P. The transuranium elements ( $^{239+240}\text{Pu}$ ,  $^{241}\text{Am}$ ) of the chernobyl parentage entering in a meadow plants. *Problems of Health and Ecology*. 2006;1(7):67–71. (In Russ.)].
9. Lux D., Kammerer L., Rühm W., Wirth E. Cycling of Pu, Sr, Cs, and other longliving radionuclides in forest ecosystems of the 30-km zone around Chernobyl. *Sci. Total Environ*. 1995;(173):375–384. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04741-7](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04741-7)
10. Sokolik, G. A., Ovsiannikova, S. V., Ivanova, T. G., & Leinova, S. L. Soil–plant transfer of plutonium and americium in contaminated regions of Belarus after the Chernobyl catastrophe. *Environ. Int*. 2004;30(7):939–947. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.03.003>
11. Kozhakhhanov T.E., Lukashenko S.N., & Larionova N.V. Accumulation of artificial radionuclides in agricultural plants in the area used for surface nuclear tests. *J. Environ. Radioact*. 2014;(137):217–226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.06.026>
12. Larionova N.V., Lukashenko S.N., Kabdyrakova A.M., Kunduzbayeva A.Y., Panitskiy A.V., & Ivanova A.R. Transfer of radionuclides to plants of natural ecosystems at the Semipalatinsk Test Site. *J. Environ. Radioact*. 2018;(186):63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.09.006>
13. Агрохимия: Учебник для сельскохозяйственных вузов. Под ред. В.М. Клеchkовского и А.В. Петербургского. 2-е изд., испр. и доп. М.: Колос, 1967. 584 с. [Agrochemistry: A textbook for agricultural. Ed. by V.M. Klechkovsky, A.V. Petersburg. 2nd ed., Corrected. and additional Moscow: Kolos, 1967. 584 p. (In Russ.)].
14. Edomskaaya M.A., Lukashenko S.N., Stupakova G.A. et al. Estimation of radionuclides global fallout levels in the soils of CIS and eastern Europe territory. *J. Environ. Radioact*. 2022;(247):106865. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2022.106865>
15. СТ РК ИСО 17294-1-2011 Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Ч. 1: Общее руководство. Доступно по: [https://online.zakon.kz/Document/?doc\\_id=31610236&pos=2;-108#pos=2;-108](https://online.zakon.kz/Document/?doc_id=31610236&pos=2;-108#pos=2;-108) Ссылка активна 06.12.2022.
16. СТ РК ИСО 17294-2-2006 Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Ч. 2. Доступно по: [https://online.zakon.kz/Document/?doc\\_id=30371803](https://online.zakon.kz/Document/?doc_id=30371803) Ссылка активна 06.12.2022.
17. ПНД.Ф 16.2.2.2.3.71-2011 Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. Доступно по: <http://gostrf.com/normadata/1/4293793/4293793107.pdf> Ссылка активна 06.12.2022.
18. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: Учебник для вузов. В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во Юрайт, 2021. 459 с. [Plant Physiology. In 2 v. V. 2: Textbook for universities. V.V. Kuznetsov, G.A. Dmitriev. 4th ed., revised. and additional. Moscow: Yurayt Publishing House, 2021. 459 p. (In Russ.)].
19. Лукашенко С.Н., Эдомская М.А. Плутоний в окружающей среде: источники, механизмы распространения, концентрации. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021;61(4):394–424. [Lukashenko S.N., Edomskaaya M.A. Plutonium in the environment: sources, dissemination mechanisms, concentrations. *Radiation biology. Radioecology*. 2021;61(4):394–424. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S086980312104007X>

## Migration of Plutonium, Micro- and Macroelements in the “Soil–Plant” System at Different Soil Moisture

M. A. Edomskaia<sup>1,\*</sup>, S. N. Lukashenko<sup>1</sup>, A. A. Shupik<sup>1</sup>,  
D. A. Zheltov<sup>2</sup>, P. V. Kharkin<sup>2</sup>, V. A. Makarova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia*

<sup>2</sup>*The Institute of nuclear physics, Almaty, Kazakhstan*

\*E-mail: ma.edomskaia@yandex.ru

In the vegetation experiment, the plutonium, micro- and macroelements migration in the “soil–agricultural plant” system depending on soil moisture in the range from 15 to 40% of absolute soil moisture were studied. The content of <sup>239</sup>Pu was analyzed by  $\alpha$ -spectrometry with preliminary radiochemical isolation. The elemental composition was analyzed by the ICP-MS and ICP-AES methods. Beans (Fabaceae) variety “Amber” were used as a test culture. The plutonium transfer factor obtained in the vegetation experiments are in the range of  $5.3 \times 10^{-4}$ – $1.5 \times 10^{-2}$ , with an average value of  $5.4 \times 10^{-3}$  for the aboveground part of bean and range of  $4.5 \times 10^{-2}$ – $2.7 \times 10^{-1}$ , with an average of  $1.6 \times 10^{-1}$  for bean roots. It was determined that the distribution of plutonium, micro and macro elements in the vegetative organs of plants is not equally, the transfer factor of plutonium for the aboveground part of plants is lower than for the root part. It has been established that the accumulation of plutonium, micro- and macroelements, depending on soil moisture, is different for the organs of beans. The dependence of plutonium accumulation by plants on soil moisture is significantly higher than for other considered elements. A decrease in the coefficient of accumulation of plutonium in the aerial part of the beans is recorded with an increase in soil moisture up to two orders of magnitude. There is a trend towards a slight decrease in the accumulation coefficients of Fe, Mg, Mn, Cr, Mo, Ni, Co, Cu. For the root system of beans, a clear dependence of the accumulation of the considered elements on soil moisture is not observed.

**Keywords:** plutonium, microelements, macroelements, migration, soil–plant system, transfer factor, beans

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

М.А. Эдомская – ORCID 0000-0002-3905-4087, общее руководство исследованием, проведение вегетационных опытов, анализ содержания плутония в образцах, обработка полученных результатов, подготовка текста статьи.

С.Н. Лукашенко – ORCID 0000-0002-6146-4613, обработка полученных результатов, подготовка текста статьи.

А.А. Шупик – ORCID 0009-0000-4651-9199, проведение вегетационных опытов, анализ содержания плутония в образцах.

Д.А. Желтов – ORCID 0000-0002-0138-7484, анализ содержания микро- и макроэлементов в образцах, подготовка текста статьи.

П.В. Харкин – ORCID 0009-0000-3422-3833, анализ содержания микро- и макроэлементов в образцах.

В.А. Макарова – ORCID 0000-0003-3615-141X, анализ содержания микро- и макроэлементов в образцах.



## ФИЛИАЛУ № 2 ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ – 65 ЛЕТ

В августе 1947 г. при Министерстве здравоохранения СССР было образовано Третье Главное управление (ныне Федеральное медико-биологическое агентство, ФМБА России), в системе которого стали организовывать медико-санитарные части, службу Госсанэпиднадзора и специализированные научные институты. По мере развития атомной индустрии и появления новых направлений науки и техники, связанных с наличием вредных и/или опасных условий труда, расширялись научные проблемы и прикладные задачи, решение которых возлагалось на Третье Главное управление Минздрава. Среди этих задач была и защита работников от негативного воздействия ионизирующего излучения, разработка мер по обеспечению безопасности труда, диагностика и мониторинг радиогенных заболеваний персонала атомной индустрии, лечение и профилактика радиационно обусловленной патологии.

Первым научным учреждением, предназначенным для решения этих проблем, стал Институт биофизики (ныне Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России), образованный в 1946 г. в Москве на базе радиационной лаборатории АМН СССР. В 40–50-е гг. прошлого века в Институте биофизики происходило становление и развитие научно-исследовательских работ в области радиологической защиты человека. Его сотрудники проводили радиологические исследования, занимались решением гигиенических проблем, связанных с обеспечением радиационной безопасности работников атомной отрасли, а также с созданием новых радиофармпрепаратов для диагностики и лечения различных заболеваний.

В 1953 г. первую продукцию выдал комбинат-816 (ныне – Сибирский химический комбинат, СХК), производственный процесс на котором связан с наличием ряда техногенных факторов, в том числе ионизирующего излучения. В 1954 г. поселок, выросший рядом со строящимся СХК около г. Томск, получил статус города, в открытой переписке он значился как “Томск-7”. Для исследования последствий радиационного воздействия на население и объекты окружающей среды 1 апреля 1957 г. в г. Томск-7 была создана газодиффузионная лаборатория Института биофизики (далее – Лаборатория), которая изначально базировалась на территории СХК, а затем на территории медико-санитарной части Третьего главного управления, обслуживающей работников этого завода. Порядок работы лаборатории был режимным, она имела почтовый адрес “п/я 314”.

К тому времени, с 1953 г., уже функционировал филиал № 1 Института биофизики в Челябинске-40 (ныне – Южно-Уральский институт биофизики, г. Озерск). После 1962 г. были созданы: филиал № 3 в пос. Кузьмолово Ленинградской обл. (ныне – НИИ гигиены, пропатонологии и экологии человека), филиал № 4 в г. Челябинск (ныне – Уральский научно-практический центр радиационной медицины), филиал № 5 в г. Ангарск (ныне – НИИ биофизики Ангарского государственного технического университета) и филиал № 6 в г. Ленинград (ныне – НИИ промышленной и морской медицины).

Заведующим Лабораторией, а затем директором Филиала № 2 Института биофизики, назначили Викторию Павловну Падерову (1927–2022), которая возглавляла его до 1968 г. В 1957 г. В.П. Падерова пригласила сослуживцев из биофизического отдела Горьковского НИИ гигиены труда и профзаболеваний на работу в Лабораторию в Томске-7. Первоначальный состав Лаборатории насчитывал всего 10 человек. На долю руководителя Лаборатории выпали многие трудности, связанные с созданием благоприятных условий для развития и поддержания исследовательской инициативы научных сотрудников, с решением материально-технических, кадровых и иных проблем для реализации их творческого потенциала. В 1961 г. В.П. Падерова была награждена медалью “За трудовую доблесть”.

В 1962 г. штат Лаборатории увеличился до 50 человек, что дало основание для ее реорганизации в филиал № 2 Института биофизики (ФИБ № 2). На базе исследований, проведенных в Лаборатории и ФИБ № 2, было защищено четыре кандидатских диссертации.

Подходил к концу установленный срок работы ФИБ № 2, все производства СХК были запущены, при этом объем работ не уменьшался. Предполагалось провести мониторинг состояния внешней среды, необходимо было также продолжить работу по изучению изотопного состава загрязнений, очистке выбросов и спецодежды, разработке и внедрению индивидуальных средств защиты органов дыхания, проблемам санитарно-технической вентиляции и др. Однако весной 1968 г. пришел приказ о закрытии ФИБ № 2. Причин тому было несколько, основная из них – недостаточное финансирование. Все документы повседневной деятельности и результаты исследований ФИБ № 2 отправлены в архив специального хранения Института биофизики.

Вехи в истории ФИБ № 2 являются важными и славными страницами в летописи радиобиологии и радиационной медицины на томской земле. Одиннадцать лет работы ФИБ № 2 оставили неизгладимый след в памяти многих его сотрудников: Архиповой Г.Г., Волковой Л.И., Воробьевой Ф.Г., Вяткиной А.С., Горбылевой Н.В., Гребневой В.Н., Гришиной Н.А., Дегтяренко З.С., Елизаровой О.Р., Копытиной А.Е., Крылова А.Н., Короткова К.Б., Куракиной А.М., Лабор Л.И., Локтева Ю.Н., Малахова Ю.Ф., Масловского Р.Я., Миронова Л.А., Пановой А.В., Перегудовой Г.И., Сорокиной В.В., Тарлова Е.Л., Трифонова Б.П., Филюшиной З.В., Храмовой А.А., Цветкова Л.Н., Цивциной В.И. и многих других самоотверженных и скромных тружеников. Все они посвятили себя радиологическим исследованиям и внедрению их результатов в практическую деятельность СХК, которые, несомненно, оказали положительное влияние на санитарно-гигиеническую ситуацию в Томской области и повысили уровень радиационной безопасности на гиганте отечественной атомной отрасли.

В 2000 г. с целью возрождения системных междисциплинарных фундаментальных и прикладных исследований медико-биологических эффектов радиационного фактора было принято решение о создании Северского

биофизического научного центра – СБН Центра (ныне ФГБУН СБН Центр ФМБА России), которое стало этапным событием в исследовании важных проблем радиобиологии и радиационной медицины в восточной части России. Инициаторами организации СБН Центра были директор ГНЦ – Института биофизики академик Л.А. Ильин и мэр (глава администрации) ЗАТО Северск Н.И. Кузьменко. Минатом России (Е.О. Адамов) и “Медбиоэкстрем” (В.Д. Рева) поддержали эту идею. Приказом ГНЦ – Института биофизики директором СБН Центра назначен Р.М. Тахауов.

Миссия СБН Центра состоит в получении данных о воздействии техногенных факторов, в том числе длительного облучения низкой интенсивности, на организм человека и биоту, объективной оценке деятельности объектов использования атомной энергии, разработке и реализации современной стратегии охраны здоровья персонала этих объектов и населения зон наблюдения. Особенность, отличающая деятельность СБН Центра от других учреждений ФМБА России, состоит в приоритетном внимании к изучению влияния “малых” доз ионизирующего излучения.

Сегодня СБН Центр – единственный специализированный институт в восточной части России, системно решающий актуальные проблемы радиационной безопасности, в том числе радиобиологии, радиационной медицины, аварийного реагирования. СБН Центр отнесен к 1-й категории – научные организации – лидеры, включен в перечень организаций оборонно-промышленного комплекса России, является взаимодействующим институтом ВОЗ и развивает сотрудничество с различ-

ными структурами международных организаций (ВОЗ, МАГАТЭ, НКДАР ООН, МКРЗ, АЯЭ ОЭСР и др.), ведущими национальными научными организациями в области радиационной безопасности, и, конечно же, с НИИ и вузами Томского научно-образовательного комплекса. За 23 года деятельности СБН Центра сформирован эффективно работающий коллектив, который включает авторитетных исследователей и молодых специалистов, успешно решающий актуальные научно-практические задачи и являющийся достойным преемником научных традиций заложенных ФИБ № 2.

Относительно недавно было время, когда радиоактивность внушала только страх, сейчас же во всем мире энергию атома все больше, а главное – безопасно, используют в мирных целях, минимизируя ее негативные последствия. В этом есть заслуга работников ФИБ № 2 и СБН Центра, целеустремленность, знания и опыт которых служат путеводным маяком для начинающих естествоиспытателей в увлекательном и востребованном процессе познания особенностей воздействия “лучистой энергии” на человека и его среду обитания.

Доктор медицинских наук, профессор

*Р.М. Тахауов*

Доктор биологических наук, доцент

*И.В. Мильто*

Ученый секретарь Северского  
биофизического научного центра

*Е.В. Курбатова*

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ. РАДИОЭКОЛОГИЯ»

Журнал «Радиационная биология. Радиоэкология» является официальным изданием Российской академии наук и публикует статьи по актуальным проблемам радиационной биологии, радиоэкологии и смежных научных дисциплин — биологической физики, генетики, физиологии, патологии, иммунологии, фармакологии, лучевой терапии, эпидемиологии, экологии. Журнал издается с 1961 года (до июля 1993 года выходил под названием «Радиобиология»), ежегодно выпускается 6 номеров журнала. Ссылки на статьи журнала индексируются в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ), библиографических базах Scopus, PubMed, научной электронной библиотеке e-LIBRARY и др. Решением Минобрнауки России журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по научным специальностям и соответствующим им отраслям науки: 1.5.1. Радиобиология (биологические науки, медицинские науки); 1.5.7. Генетика (биологические науки, медицинские науки); 1.5.15. Экология (биологические науки); 3.3.3. Патологическая физиология (биологические науки, медицинские науки); 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (биологические науки, медицинские науки).

К опубликованию в журнале принимаются оригинальные статьи на русском и английском языках. Не допускается направление статей, материалы которых уже напечатаны в других изданиях или представлены для печати в другие издательства.

В рукописи статьи обязательно должна быть представлена информация о соблюдении этических норм и стандартов:

- информация о соблюдении стандартов работы с животными;
- информация о исследованиях, где в качестве объектов выступают люди;
- все источники финансирования работы каждого автора и всего коллектива авторов;
- информация о конфликтах интересов.

Статья должна быть подписана всеми авторами. Также необходимо указать имя, отчество, фамилию, почтовый адрес, телефон и e-mail автора, с которым следует вести переписку.

На рукопись статьи должно быть оформлено направление (сопроводительное письмо) от учреждения, в котором выполнялась основная часть работы, и экспертное заключение об отсутствии ограничений на публикацию материалов в открытой печати.

Статьи и все сопроводительные документы следует направлять в редакцию на адрес электронной почты [gadbio@rgan.ru](mailto:gadbio@rgan.ru). Весь комплект материалов нужно переслать в редакцию только в электронном виде, бумажные версии материалов не требуются. Материалы,

направленные в редакцию заказными и ценными письмами, возвращаются авторам без рассмотрения.

Опубликование представленных материалов в журнале возможно только после заключения «Лицензионного договора о предоставлении права использования статьи в научном журнале, учредителем (соучредителем) которого является Российская академия наук». Скан-копию подписанного авторами лицензионного договора после получения подтверждения из редакции о принятии статьи к опубликованию следует направить в редакцию на адрес электронной почты [gadbio@rgan.ru](mailto:gadbio@rgan.ru). При отсутствии подписанного со стороны авторов лицензионного договора статьи к публикации не принимаются.

Статьи, присланные авторами в редакцию, проходят двойное слепое рецензирование ведущими специалистами отрасли, решение об их опубликовании принимается на заседании редакционной коллегии. Редакция сохраняет первоначальную дату поступления статьи (а, следовательно, и очередность публикации) при условии возвращения ее в редакцию после исправления замечаний рецензентов не позднее чем через 1 месяц после получения рецензий.

Корректуру принятой в печать статьи издательство рассылает авторам по электронной почте. Автор в течение указанного в сопроводительном письме срока должен ответным сообщением (не меняя тему письма!) передать правку статьи в редакцию.

Подготовка рукописей и издательское оформление статей в журнале осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 7.0.7-2021 «Национальный стандарт Российской Федерации. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Статьи в журналах и сборниках. Издательское оформление».

### ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЬИ

Журнал публикует оригинальные экспериментальные, клинические, эпидемиологические, теоретические статьи и обзоры, дискуссионные и исторические статьи, рецензии на книги, письма в редакцию, хронику событий научной жизни. Объем обзорных и теоретических статей не должен превышать 40 страниц машинописного текста, экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследований — 25 страниц, дискуссионных и исторических статей — 10 страниц, рецензий и научной хроники — 5 страниц. В этот объем входят текст, иллюстрации (рисунки, фотографии), таблицы и список литературы.

Основной текст статьи должен быть структурирован, набран на компьютере в текстовом редакторе Word на одной стороне листа формата А4 шрифтом Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Ориентация текста книжная, поля везде по 2 см, нумерация страниц — сверху в центре, первая страница без номера.

Рукопись статьи должна содержать следующие обязательные разделы: 1) индекс УДК; 2) заголовок статьи; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) аффилиация авторов – полные названия учреждений, город, страна; 5) электронная почта автора, ответственного за переписку; 6) аннотация (резюме) на русском языке; 7) ключевые слова на русском языке; 8) текст статьи, включая основные разделы, формулы и иллюстрации; 9) благодарности, источники финансирования, информация о конфликте интересов; 10) список литературы; 11) заголовок статьи на английском языке; 12) инициалы и фамилии авторов на английском языке; 13) аффилиация авторов (полные названия учреждений, город, страна) на английском языке; 14) электронная почта автора, ответственного за переписку; 15) аннотация (резюме) на английском языке; 16) ключевые слова на английском языке; 17) информация об авторах с указанием индекса ORCID и вклада авторов в подготовку публикации; 18) отдельный лист подписей к рисункам на русском и английском языках; 19) копии рисунков (схем, фотографий и т.п.) в порядке их упоминания в текста – каждый рисунок на отдельной странице.

В начале статьи в левом верхнем углу указывается индекс УДК. Авторы могут найти индекс УДК для своей статьи в библиотечных классификационных таблицах, разработанных ВИНИТИ, или на открытых онлайн ресурсах, например, на сайте <https://www.teacode.com/online/udc/> или <https://udcode.ru/>

На следующей строке прописными буквами печатается заголовок (название) статьи. Заголовок статьи должен быть максимально кратким и информативным, не содержать сокращений.

Затем, на следующей строке печатаются инициалы и фамилии авторов. Если соавторы относятся к разным учреждениям, то необходимо в конце фамилии каждого соавтора указывать в верхнем регистре цифровую ссылку (1, 2 и т. д.), а перед названием соответствующего учреждения эту ссылку следует воспроизвести. Автор, ответственный за переписку, обозначается звездочкой.

После фамилий авторов отдельной строкой дается название учреждения(й), города и страны (например, Россия, Беларусь и т. п.). Приводятся полные официальные названия учреждений с указанием ведомственной принадлежности, при этом префиксы учреждений, отражающие форму собственности или статус организации (ФГБУ, ФБУН, ГОУ ВПО и т. п.) не указываются.

На следующей строке указывают адрес электронной почты (E-mail) автора, ответственного за переписку.

После титульной части через одну пустую строку размещается аннотация (резюме) объемом не более 250 слов. Аннотация должна быть краткой, не более 1 страницы, сжато и ясно описывающей актуальность и цель исследования, использованные материалы и методики, основные конкретные результаты работы и вытекающие из нее выводы. Рекомендуемая структура аннотации для экспериментальных, клинических и эпидемиологических статей: 1) Введение (Introduction); 2) Материалы и методы (Materials and Methods); 3) Результаты и обсуждение (Results and Discussion); 4) Выводы (Conclusion) – все пишется сплошным текстом, без выделения заголовков, подразделов и абзацев. Для статей обзорного и теоретического характера аннотация должна включать краткое изложение основной концепции статьи. В аннотации не допускается использование сокращений и аббревиатур, кроме общепринятых в научной литературе.

После аннотации приводят ключевые слова (словосочетания), которые должны соответствовать теме статьи, отражать ее результаты, предметную и терминологическую сущность. Количество ключевых слов не должно быть меньше трех и больше 12; их приводят, предваряя словами “Ключевые слова”, и отделяют друг от друга запятыми. Ключевые слова также не должны содержать аббревиатур и сокращений.

Название работы, инициалы и фамилии авторов, официальные наименования учреждений, в которых выполнена работа, текст аннотации, ключевые слова должны быть также переведены на английский язык и вместе с русскоязычным вариантом представлены на отдельных страницах после основного текста статьи.

Далее, через два полуторных интервала после ключевых слов, следует основной текст статьи.

Текст статьи, в которой представляются экспериментальные материалы авторов, должен состоять из введения и выделяемых заголовками разделов: “Материалы и методика”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Заключение”, “Список литературы”. Статьи теоретического характера обычно не имеют раздела “Материалы и методика”. Обзоры литературы должны иметь введение, разделы по отдельным обсуждаемым вопросам и заключение.

Во введении (заголовком не выделяется) в максимально лаконичной форме должна быть изложена актуальность исследования, существо и новизна рассматриваемой задачи с кратким анализом близких по тематике работ других авторов, цель работы. Введение должно быть кратким, информативным и не должно быть обзором литературы.

*Цитированная литература* во введении и последующем тексте статьи приводится цифрами в квадратных скобках, желательнее в конце фразы. Номера ссылок в тексте должны идти строго по порядку их появления в рукописи.

В начале раздела “МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА” должны быть четко описаны *материалы* и/или объекты исследования (для людей – число обследованных лиц, их половозрастная характеристика, особенности работы, проживания и т. п.; для животных – вид, линия, пол, масса, возраст, число особей, вид обезболивания, способ эвтаназии и т. п.), дизайн исследования (варианты опытов), источники и вид излучения, дозы, мощность дозы, условия облучения.

При проведении экспериментов на животных или исследований с участием людей обязательно должны быть представлены сведения *о соответствии процедур этическим нормам и стандартам*. Работы, в которых не гарантируется соблюдение биоэтических принципов, к рассмотрению не принимаются.

Если работа выполнена на животных, должна быть представлена информация о соблюдении биоэтических норм, например, “Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации и принципам Базельской декларации. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Проведение исследования разрешено Комитетом по биоэтике (название организации), протокол № ... от ... (номер и дата протокола)”.

При публикации результатов исследований с участием людей рекомендуется указать, что “Все процедуры,

выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании". Также необходимо привести номер и дату протокола (био)этического комитета организации, в котором было одобрено проведение данного исследования.

Все единицы измерений, в т. ч. радиационные, следует приводить в соответствии с Международной системой единиц измерения (СИ). Дозы облучения должны быть выражены в Кл/кг, Гр или Зв (или их производных сГр, мЗв и т. п.), мощности доз – в А/кг, Гр/ч, Зв/год, активность – в Бк, удельная активность – в Бк/кг, плотность радиоактивного загрязнения поверхностей – в Бк/м<sup>2</sup> и т. п. При необходимости, после радиационных единиц системы СИ допускается указание в скобках внесистемных единиц (Р, Р/с, рад, бэр, Ки, Ки/км<sup>2</sup> и т.п.).

При описании *методики* исследования можно ограничиться указанием на существо (принцип) примененного метода со ссылкой на источник заимствования, в случае модификации – указать, в чем конкретно она заключается. Оригинальный метод должен быть описан полностью. Приведенное описание методов исследования должно гарантировать возможность воспроизведения полученных авторами результатов.

В конце раздела обязательно должны быть указаны конкретные *статистические методы*, программное обеспечение и статистические критерии, которые использовались для математической обработки данных. При использовании параметрических методов статистики следует указать на проведенную проверку результатов исследования на нормальность распределения (в противном случае нужно использовать непараметрические методы). Следует указать, какая величина вероятности (*p*) принята за критическую при интерпретации результатов статистического анализа (например,  $p < 0.05$ ).

В разделе “РЕЗУЛЬТАТЫ” полученные данные приводятся в табличной форме или на рисунках, и с кратким описанием существа полученных результатов с указанием на сходство или различие их с данными литературы. Данные, представленные в таблицах и на рисунках, не должны дублироваться, их описание в тексте не должно полностью повторять приведенные в таблицах или на рисунках результаты (в тексте описывают только самое важное и/или обобщающее). Названия таблиц и рисунков должны быть приведены на двух языках – русском и английском.

*Таблицы* должны содержать только необходимые данные и представлять собой обобщенные сведения, без включения в них легко выводимых величин. Все результаты измерений, представленные в таблицах, должны быть обработаны и оценены с применением методов вариационной статистики.

Слово “Таблица 1” (Table 1) и ее номер выделяют жирным шрифтом и располагают у левого поля над таблицей; далее, после точки, с заглавной буквы следует название таблицы (обычный шрифт). Названия таблиц должны быть приведены на русском и английском языках. При необходимости, под нижним левым углом таблицы после слова “Примечание” (обычный шрифт) приводится

расшифровка входящих в таблицу символов, сокращений, уровней статистической значимости и т.п.

Таблицы, как и основная часть статьи, должны быть набраны на компьютере в текстовом редакторе Word.

Формулы в тексте статьи необходимо распечатать крупно, четко, выделяя мало различающиеся по написанию строчные и прописные буквы: Р и р, С и с и т. д. Математические и физические величины в формулах должны обозначаться курсивным шрифтом. Формулы должны быть набраны в редакторах MathType или Latex, либо приведены в виде сканированных рисунков.

Рисунки в тексте статьи не приводят, они должны быть представлены отдельными графическими файлами. В тексте статьи указывают только место размещения рисунка, которое необходимо отметить порядковым номером рисунка и названием (только текст, без картинки!), расположить в тексте статьи отдельным абзацем, следующим за абзацем с упоминанием рисунка (ссылкой на рисунок).

*Например:*

Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи.

Рис. 1. Название рисунка

Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи. Текст статьи.

Раздел “ОБСУЖДЕНИЕ” должен содержать интерпретацию результатов и объяснение возможных механизмов выявленных изменений. Здесь проводится соотношение результатов собственных наблюдений с другими исследованиями в изучаемой области знаний, с учетом данных литературы дается авторская трактовка существа и научной значимости полученных в ходе исследования результатов, формулируются гипотезы (теории), объясняющие сущность выявленных явлений. При обсуждении полученных результатов основной акцент необходимо делать на релевантные работы, вышедшие в последние 5–10 лет. Следует избегать повторения сведений из введения и перечисления данных, ранее представленных в тексте и таблицах при описании результатов исследования.

Завершает изложение основного текста статьи раздел “ЗАКЛЮЧЕНИЕ”, в котором формулируются основные выводы проведенного исследования, предложения по перспективам дальнейших исследований и практического применения полученных результатов.

После изложения основного текста статьи следует раздел “БЛАГОДАРНОСТИ”, в котором приводятся слова благодарности за помощь в выполнении исследования (если таковые есть).

Далее отдельными абзацами представляются сведения об источнике финансирования (например, “Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № .....” или “Работа выполнена без целевого финансирования”), а также информация об отсутствии конфликта интересов. Если конфликта интересов нет, используют формулировку: “Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи”; если конфликт интересов имеется, приводят его детализацию. Сведения о финансировании исследования и/или подготовке статьи также могут быть приведены отдельно в разделе “ФИНАНСИРОВАНИЕ”.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ** размещается после текста статьи. Он должен содержать, кроме основополагающих, публикации за последние 5–10 лет. В журнале не приветствуются самоцитирование, в списке литературы допускается не более 15–20% самоцитирующих ссылок.

Список литературы формируется в виде пронумерованного списка библиографических источников в порядке их цитирования в основном тексте статьи (в порядке упоминания источников в тексте, а не в алфавитном порядке!), безотносительно того, на каком языке они написаны или цитируются. Список литературы должен включать только опубликованные материалы, ссылки на неопубликованные работы не допускаются. Каждый элемент в списке литературы должен содержать ссылку на один источник, цитирование одной и той же работы под разными номерами не допускается.

Библиографическое описание ссылок на источники литературы следует оформлять в формате Vancouver версии АМА, используемемся в международных библиографических базах PubMed, Scopus, Web of Science и др. При описании цитируемых публикаций следует пользоваться следующими правилами:

- статьи из журналов и сборников: фамилии и инициалы всех авторов, заголовок статьи, название журнала (курсивом), год, (через точку с запятой) том, (в скобках) номер, (через двоеточие) страницы — первая и последняя;
- книги: фамилии и инициалы всех авторов, полное название книги, инициалы и фамилии редакторов (если есть), город, (через двоеточие) издательство, год, страница (если ссылка не на всю книгу) или число страниц в книге;
- диссертации: фамилия и инициалы автора, полное название диссертации, на соискание какой степени, каких наук, город, учреждение, в котором выполнена работа, год;
- патенты: фамилии и инициалы всех авторов, номер патента, название изобретения, номер и дата заявки, дата опубликования, число страниц.

Для оптимизации библиографического описания источников знаки двойная косая (/ /), отделяющая заголовок статьи от названия журнала (книги), точка и тире (. —), который отделяет зоны библиографической записи, не ставят.

Независимо от числа авторов все они помещаются в начале библиографической записи. В идеале должны быть указаны фамилии и инициалы всех авторов, но, если авторов 5 и более, можно указать фамилии первых 3-х авторов, после чего дать сокращенное словосочетание “и др.” (“et al.” — англ.).

При описании названий научных журналов необходимо использовать стандартную аббревиатуру (сокращение) названия журнала в соответствии с ISSN List of Title Word Abbreviations (см. ISSN.org LTWA или CASSI) и/или MedLine. Если Вы не уверены в правильности сокращенного варианта, пожалуйста, используйте полное название журнала. Название журнала указывают курсивом.

Для источников, опубликованных на русском языке, библиографическое описание должно состоять из двух частей — на русском языке и на латинице. Сначала необходимо дать русскоязычную часть описания источника, затем в квадратных скобках следует привести перевод библиографического описания источника на английский язык. Официальный перевод библиографического описания источника можно найти в

Российском индексе научного цитирования на сайте <http://elibrary.ru> или в PubMed, если источник там индексируется. В конце англоязычного описания источника в скобках указывается, что оригинальная публикация вышла на русском языке (In Russ.), после чего ставится закрывающая квадратная скобка.

Если у русскоязычного источника нет официального перевода библиографического описания на английский язык, в квадратных скобках после авторов сначала необходимо привести транслитерированное оригинальное название публикации, затем, после знака равенства, перевод названия на английский язык (аналогичным образом приводится название журнала, если нет официального названия на английском языке). Транслитерация осуществляется по стандарту British Standards Institution (BSI), для ее автоматизированного проведения можно воспользоваться сайтом <http://translit.net/> или <http://translit.ru/>.

Для каждого цитируемого элемента в конце библиографической ссылки желательно указывать цифровой идентификатор DOI (Digital Object Identifier) в формате “<https://doi.org/10.101/.....>” (если есть). Уточнить наличие у цитируемого материала DOI можно на сайтах <http://search.crossref.org> или <https://www.citethisforme.com> (последний сайт помимо DOI автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования Vancouver версии АМА).

После списка литературы на отдельной странице размещается аннотация и ключевые слова на английском языке. Тексту аннотации предшествуют название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное официальное название учреждений, город, страна на английском языке. Перевод названия, фамилий авторов, учреждений, текста аннотации и ключевых слов на английский язык должен полностью соответствовать материалу, представленному в русскоязычном варианте.

После этого на отдельной странице на русском и английском языках размещается **ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ**, которая должна включать для каждого автора его фамилию, имя и отчество, 16-значный открытый идентификатор ученого (Open Researcher and Contributor ID — ORCID), место работы (учреждение, в котором выполнялось исследование), адрес учреждения (город и страна) и адрес электронной почты (e-mail). Идентификатор ORCID можно получить на портале <http://orcid.org>. Фамилии, имя, отчество авторов на английском языке должны соответствовать написанию, имеющемуся в зарубежных библиографических базах, а наименование учреждения — официальному наименованию на английском языке, указанному в Уставе учреждения.

После информации об авторах на русском и английском языках приводят сведения о вкладе каждого автора в подготовку публикации (после слов “Вклад авторов:”) — после фамилии и инициалов каждого автора в краткой форме описывается его личный вклад в написание статьи (идея, сбор материала, обработка материала, написание статьи, научное редактирование текста и т. д.). Если статья подготовлена с равным участием каждого из авторов, используют формулировку: “Вклад авторов: все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации”.

После этого, на отдельном листе размещают **ПОДПИСИ К РИСУНКАМ** (графикам, схемам, фотографиям и т.п.). Лист подписей к рисункам должен

содержать информацию обо всех рисунках (иллюстрациях), на которые есть ссылки в статье: номер рисунка (в порядке упоминания в тексте), его название, все надписи, расположенные на рисунке, а также расшифровку всех обозначений, использованных на рисунке.

Номер и название рисунка должны быть представлены на русском и английском языках. Слово “Рис. 1” (Fig. 1) выделяют жирным шрифтом; далее, после точки, с заглавной буквы следует название рисунка (обычный шрифт). На следующей после заголовка рисунка строке размещают подрисуночные подписи, на которых приводят расшифровку всех представленных на рисунке линий, символов, деталей. В подписях к гистологическим срезам и микрофотографиям необходимо указывать метод окраски и масштабный отрезок. Подрисуночные подписи также должны быть приведены на русском и английском языках.

### ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

*Иллюстрации* (рисунки, графики, схемы, фотографии и т. п.) представляют в редакцию в виде отдельных графических файлов. Каждый файл должен содержать только одну иллюстрацию. Если иллюстрация состоит из нескольких частей, все они должны быть сгруппированы в один файл с правильным расположением частей.

Файлы иллюстраций должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, какой статье они принадлежат, и каков порядок их расположения в тексте. Название каждого файла должно содержать фамилию первого автора и порядковый номер рисунка в настоящей статье (например: “Иванов\_1\_Принципиальная схема.eps”)

Иллюстрации (рисунки, графики, схемы, фотографии и т. п.) должны быть четкие, контрастные, содержать все необходимые обозначения координатных осей, кривых, линий, других деталей. Подписи на рисунках, в том числе и надписи на осях координат, должны быть выполнены на русском языке. Все оси, линии, кривые, символы должны быть изображены четко, с размерами, позволяющими уменьшать или увеличивать рисунок при редакционной подготовке статьи.

Технические требования к иллюстрациям:

- иллюстрации представляются в итоговом варианте, т. е. не предполагают существенных авторских изменений и дополнений, а также не содержат исправлений и пояснений, отображаемых на полях или иллюстрациях;
- форматы файлов: \*.tif, \*.eps, \*.png, \*.jpg, \*.ai; \*.xls (допустимо для графиков, диаграмм);
- цветовая модель Grayscale (Black 95%), разрешение 250 dpi при 100% величине;
- цветовая модель Bitmap, разрешение не менее 1200 dpi;
- толщина линий не менее 0,16 мм;
- белое поле между двумя линиями, объектами, пятнами, буквами и пр. — не менее 0,2 мм;
- не следует использовать точечные закраски в программах работы с векторной графикой;
- не следует добавлять сетку или серый фон на задний план графиков и схем;
- иллюстрации не должны содержать подрисуночные подписи;
- каждый файл должен содержать только один рисунок.

### РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ПОДГОТОВКЕ СТАТЕЙ

При подготовке статьи пользуйтесь рекомендациями, изложенными ниже.

Линии мышей, крыс и других лабораторных животных следует обозначать латинскими буквами: C57B1, BALB/c и т. д., гибриды 1-го поколения обозначаются с указанием родительских линий как (CBA × C57B1)F<sub>1</sub>.

Дизайн исследования обязательно должен включать как минимум две группы — опыт и контроль. При описании вариантов опытов обязательно необлучаемый контроль к каждому сроку наблюдения, а не только исходные данные (данные до воздействия).

Вид излучения следует обозначать греческими символами — α-, β-, γ-излучение, σ-электроны и т. п. или использовать общепринятые названия, например, рентгеновское излучение (но не X-лучи!). При описании условий облучения рекомендуется использовать выражения: “подвергали воздействию γ-излучения (α-, β- или рентгеновского излучения) от источника <sup>60</sup>Co (указать символ радионуклида источника излучения, массовое число при нем — слева сверху, напр.: <sup>60</sup>Co или <sup>137</sup>Cs) на установке “ИГУР” (указать название)” или “облучение проводили на рентгеновской установке “РУМ-10”. Например: “Крыс подвергали общему воздействию рентгеновского излучения на установке “РУМ-17” (или “Крыс подвергали облучению на рентгеновской установке “РУМ-10”) в дозе 8.5 Гр при мощности дозы 1.5 Гр/с, напряжении 250 кВ, силе тока 15 мА, фильтр 0.5 ± 0.1 мм А1 (или “использовали нефильТРованное излучение”), фокусное расстояние 30 см”.

Недопустимо употребление выражений типа “облучали α- (β-, γ-) лучами”, “облучали дозой” или “облучали на источнике γ-облучения”, “рентгеновское или γ-облучение” (вместо рентгеновское или γ-излучение), “облучали дозой...”, “при малых дозах облучения” и т.п.

Словосочетание “летальная (смертельная) доза” с указанием смертности при ней в процентах (числитель дроби) и длительности наблюдения в сутках (знаменатель дроби) дается сокращенно — ЛД<sub>50/30</sub>, ЛД<sub>100/5</sub>, ЛД<sub>15/45</sub>.

При использовании лекарственных средств точно указываются их международные непатентованные названия — МНН (использование коммерческих названий не рекомендуется), дозы и способы применения (пути введения). После названия лекарственных средств в скобках следует указывать компанию производителя и страну производства.

Названия аппаратов и приборов, наименование программного обеспечения следует приводить на языке оригинала с указанием в скобках фирмы (если есть) и страны производства, например, γ-излучатель “ЭГО-4” (Россия), спектрофотометр “СФ-16” (Россия), спектрофотометр “Hitachi U-2900” (Hitachi, Япония), спектрометр “BrukerAvance III” (Bruker, Германия), программное обеспечение “BWSpec 4.10\_4” (B&W ТЕК, США), программа “Excel” (Microsoft Office, США).

При первом упоминании терминов, неоднократно используемых в статье (кроме общепринятых сокращений типа ДНК, РНК и пр.), необходимо давать их полное наименование и сокращение в скобках, в последующем применять только сокращение. Следует помнить, что сокращения создают помехи для читателя, поэтому их применение должно быть сведено

к минимуму. Сокращение проводится по ключевым буквам слов в русском написании, например: метокситриптамин (МОТ), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) и т.д.

Название простых ионов следует приводить только символами:  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $O_2$  (супероксидный анион-радикал) и т. д., сложных многоатомных — словами или сокращением, например: ион НАДФ.

Все результаты измерений, приводимых в статье, должны быть выражены в единицах системы СИ: длина — в м, мм или мкм; площадь — в  $m^2$ ,  $mm^2$ ; объем — в  $m^3$ ,  $dm^3$ , время в секундах — с (как исключение, допускается использование внесистемных единиц времени — минут (мин), часов (ч) и суток (сут)); масса — в г, кг; количество вещества — в моль; массовая концентрация — в  $kg/m^3$ , г/л, мг/л; молярность — моль/ $m^3$ , моль/л, ммоль/л; моляльность — моль/кг, ммоль/кг; количество эритроцитов в крови —  $\times 10^{12}/л$ ; лейкоцитов —  $\times 10^9/л$ ; лимфоцитов —  $\times 10^9/л$ .

#### Пример оформления титульной части статьи:

УДК 575.224.4:633.367.1:581.14

### ВЛИЯНИЕ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН НА ВНУТРИСОРТОВУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЛЮПИНА ЖЕЛТОГО

Н. В. Новик<sup>1</sup>, С. А. Гераскин<sup>2,\*</sup>, И. А. Якуб<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт люпина — филиал Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В. Р. Вильямса, Брянск, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия

\*E-mail: geraskin@riar.obninsk.org

С целью получения мутантных форм люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) семена сорта Булат (обычный морфотип) и селекционного номера с.н. 12-11-02-2-4-1эп (эпигональный морфотип) облучали на установке ГУР-120 (60Со) при следующих соотношениях доза/мощность дозы: 200 Гр (60 Гр/ч); 300 Гр (60 Гр/ч); 400 Гр (60 Гр/ч); 200 Гр (100 Гр/ч); 300 Гр (100 Гр/ч); 400 Гр (100 Гр/ч). В ходе лабораторного эксперимента установлены статистически значимые различия .....

Ключевые слова: радиационный мутагенез,  $\gamma$ -облучение, люпин желтый, всхожесть, выживаемость, продуктивность, внутрисортовая изменчивость.

#### Примеры библиографического описания источников литературы:

- Для журнальных статей:

Лебедева-Георгиевская К.Б., Кохан В.С., Шуртакова А.К. и др. Нейробиологические эффекты комбинированного воздействия антиортостатического вывешивания и ионизирующих излучений различного качества. *Нейрохимия*. 2019;36(3):254–264. [Lebedeva-Georgievskaya K.B., Kohan V.S., Shurtakova A.K. et al. Neurobiological effects of combined exposure to anti-orthostatic hanging and ionizing radiation of various quality. *Neurochemistry*. 2019;36(3):254–264 (In Russ.)]. <http://doi.org/10/1134/S1027813319030105>.

Гребенюк А.Н., Аксенова Н.В., Петров А.В., Аль-Шехадат Р.И., Климов Н.А., Симбирцев А.С. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности. *Вестн. Рос. воен.-мед. академии*. 2013;3:75–80. [Grebenyuk A.N., Akse-nova N.V., Petrov A.V., Al'-Shekhatat R.I., Klimov N.A., Simbirtsev A.S. Poluchenie razlichnykh variantov rekombinantnogo flagellina i otsenka ikh radiozashchitnoy effektivnosti = Preparation of different recombinant flagellin variants and evaluation of their radioprotective efficacy. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2013;3:75–80. (In Russ.)].

Clement C., Rühm W., Harrison J. et al. Keeping the ICRP Recommendations Fit for Purpose. *J. Radiat. Prot.* 2021;41(4):1390–1409. <https://doi.org/10.1088/1361-6498/ac1611>

- Для книг:

Ушаков И.Б. Космос. Радиация. Человек: Радиационный барьер в межпланетных полетах. М.: Научная книга, 2021. 348 с. [Ushakov I.B. Kosmos. Radiatsiya. Chelovek: Radiatsionnyy bar'er v mezplanetnykh poletakh = Space. Radiation. Human: Radiation barrier in interplanetary flights. Moscow: Nauchnaya kniga, 2021. 348 p. (In Russ.)]

UNSCEAR 2010. Report to the General Assembly, with Scientific Annex. V. I. Ann. A. Medical radiation exposures. New York: United Nations. 2010. P. 23–220.

- Для статей в сборниках:

Лебединский А.В. О влиянии ионизирующего излучения на организм животного. В кн.: Действие излучения на организм: Доклады советской делегации на Международной конференции по мирному использованию атомной энергии, Женева, 1955. М.: Изд-во АН СССР, 1955. С. 43–77. [Lebedinsky A.V. O vliyanii ioniziruyushchego izlucheniya na organizm zhivotnogo = On the effect of ionizing radiation on the body of an animal. In: Action of radiation on the body: Reports of the Soviet delegation at the International Conference on the Peaceful Use of Atomic Energy, Geneva, 1955. Moscow: Izd-vo AN SSSR, 1955. P. 43–77. (In Russ.)]

Pierce D.A. Statistical aspects on RERF cancer epidemiology. In: National Research Council. Effects of Ionizing Radiation: Atomic Bomb Survivors and Their Children (1945-1995). Washington, DC: The National Academies Press, 1998. P. 28–116.

- Для диссертаций и авторефератов:

Салеева Д.В. Роль некодирующих РНК в активности генов при действии радиации в нормальных и злокачественных клетках in vivo и in vitro: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: ГНЦ — ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2021. [Saleeva D.V. Rol' nekodiruyushchikh RNK v aktivnosti genov pri deistvii radiatsii v normal'nykh i zlokachestvennykh kletkakh in vivo i in vitro = Role of noncoding RNAs in gene activity under the action of radiation in normal and malignant cells in vivo and in vitro: Avtoref. dis. ... kand. med. nauk = Ph. D. Med. Sci. Thesis. M.: GNTs — FMBTs im. A.I. Burnazyana FMBA Rossii, 2021. (In Russ.)]

Trent J.W. Experimental Acute Renal Failure: Ph. D. Thesis, University of Southern California, Los Angeles, 1975.

- Для патентов:

Ковтун В.Ю., Белолов А.Ю., Давидович Ю.А. и др. Патент № 2509557 Российская Федерация, МПК А61К, А61Р. Фармацевтическая композиция для купирования первичной реакции на облучение и ранней преходящей недееспособности. № 2012127004/15, заявл. 28.06.2012, опублик. 20.03.2014 Бюл. № 8. 10 с. [Kovtun V.Yu., Belovolov



A.Yu., Davidovich Yu.A. i dr. Patent № 2509557 Rossiiskaya Federatsiya, МПК А61К, А61R. Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya kupirovaniya pervichnoi reaktsii na obluchenie i rannei prekhodyashchei nedeеспosobnosti = Pharmaceutical composition for the management of primary reaction to radiation and early transient incapacitation. № 2012127004/15, Appl. 28.06.2012, Publ. 20.03.2014 Bull. 8. 10 p.]

***Пример представления информации об авторах:***

Жигалина Анна Анатольевна (Zhigalina Anna Anatolievna), <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия (St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia), zhigalina.anna@spcru.ru