

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 60, номер 5, 2020

---

---

## Методология научного поиска

Критерий Хилла “Биологическое правдоподобие”. Интеграция данных из различных дисциплин в эпидемиологии и радиационной эпидемиологии

*А. Н. Котеров, Л. Н. Ушенкова, А. П. Бирюков*

453

---

## Молекулярная радиобиология

Радиационно-индуцированные нарушения метилирования ДНК: исследования *in vitro* и *in vivo*

*Н. С. Кузьмина*

481

---

## Радиационная генетика

Особенности генотоксического действия  $\alpha$ -излучения в тест-системах *Drosophila melanogaster*

*З. М. Бияшева, М. Ж. Тлеубергенова, Ю. А. Зарипова,  
В. В. Дьячков, С. Ж. Колумбаева*

507

---

## Радиобиологические основы лучевой терапии опухолей

Гипертермия как способ повышения радиочувствительности опухолевых клеток, невосприимчивых к фармакологическим радиосенсибилизаторам

*А. В. Хохлова, А. О. Якимова, В. А. Мосина,  
Е. И. Селиванова, А. Е. Кабаков*

516

---

## Комбинированные воздействия

Закономерности проявления синергического взаимодействия тяжелых металлов с гипертермией или ионизирующим излучением

*М. С. Толкаева, А. Н. Филимонова, О. А. Воробей,  
Е. С. Евстратова, В. Г. Петин*

524

---

## Неионизирующие излучения

Значимость адекватной информации по оценке опасности ЭМП сотовой связи для здоровья населения (первая четверть XXI века)

*Ю. Г. Григорьев*

532

---

## Радиоэкология

Ранжирование реакторных установок на основе оценки потенциального радиационного воздействия на природную среду

*С. И. Спиридонов, Р. А. Микаилова*

541

Модель распределения частиц хронических радиоактивных  
выпадений в луговом биогеоценозе

*А. Н. Перволоцкий, Т. В. Перволоцкая*

550

---

**Хроника**

Мальцев Вячеслав Николаевич (26.07.1937–12.06.2020)

558

Памяти Владимира Фёдоровича Михайлова

559

---

---

# Contents

---

---

Vol. 60, No. 5, 2020

---

---

## Methodology of Scientific Research

Hill's Criteria "Biological Plausibility". Integration of Data from Various Disciplines for Epidemiology and Radiation Epidemiology

*A. N. Koterov, L. N. Ushenkova, A. P. Biryukov*

453

---

## Molecular Radiobiology

Radiation-induced DNA Methylation Changes: *in vitro* and *in vivo* Studies

*N. S. Kuzmina*

481

---

## Radiation Genetics

Features of Genotoxic Exposure by  $\alpha$ -Radiation in *Drosophila melanogaster* Test-systems

*Z. M. Biyasheva, M. Zh. Tleubergenova, Yu. A. Zaripova,  
V. V. Dyachkov, S. Zh. Kolumbaeva*

507

---

## Radiobiological Basis of Radiation Therapy of Tumors

Hyperthermia as a Method of Radiosensitization of Tumor Cells Unsusceptible to Pharmacological Radiosensitizers

*A. V. Khokhlova, A. O. Yakimova, V. A. Mosina,  
E. I. Selivanova, A. E. Kabakov*

516

---

## Combined Effects

Patterns of Synergic Interaction Display after Heavy Metals Combined with Hyperthermia or Ionizing Radiation

*M. S. Tolgayeva, A. N. Filimonova, O. A. Vorobey,  
E. S. Evstratova, V. G. Petin*

524

---

## Non-Ionizing Radiation

Significance of Adequate Information about the Danger of Cellular Connection for Health of Population in the XXI Century

*Yu. G. Grigoriev*

532

---

## Radioecology

Ranking of Reactor Facilities Based on the Assessment of Potential Radiation Impact on the Environment

*S. I. Spiridonov, R. A. Mikailova*

541

Model of Distribution of Particles of Chronic Radioactive Fallout  
in Meadow Biogeocenosis

*A. N. Perevolotsky, T. V. Perevolotskaya*

550

---

**Chronicle**

Maltsev Vyacheslav Nikolaevich (26.07.1937–12.06.20220)

558

In Memory of Vladimir Fyedorovich Mikhailov

559

---

---

МЕТОДОЛОГИЯ  
НАУЧНОГО ПОИСКА

УДК 167:61:573.01:616.036.22

КРИТЕРИЙ ХИЛЛА “БИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРАВДОПОДОБИЕ”.  
ИНТЕГРАЦИЯ ДАННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ДИСЦИПЛИН  
В ЭПИДЕМИОЛОГИИ И РАДИАЦИОННОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ<sup>#</sup>

© 2020 г. А. Н. Котеров<sup>1,\*</sup>, Л. Н. Ушенкова<sup>1</sup>, А. П. Бирюков<sup>1</sup>

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

\*E-mail: govorilga@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.09.2019 г.

После доработки 29.09.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

В обзоре рассмотрены различные аспекты критерия причинности “Биологическое правдоподобие” (“Biological plausibility”), иногда заменяемого критерием “Coherence” (согласованность с известным медико-биологическим знанием). Отмечается значимость критерия для эпидемиологических доказательств причинности, особенно для таких дисциплин (экология, токсикология, канцерогенез), в которых есть трудности не только в постановке экспериментов, но даже в самом наблюдении эффекта. Одни статистические подходы в эпидемиологии не способны доказать истинную причинность связи (возможно влияние случайностей, конфаундеров, смещений и обратной причинности). Без знания биологического механизма, правдоподобной модели, такие связи (в особенности слабые) не могут расцениваться как подтверждение истинной причинности эффекта от воздействия. Суть критерия сводится к интеграции данных из различных медико-биологических дисциплин, включая молекулярные эксперименты, опыты на животных и *in vitro*. Выделяют три (Weed D.L., Hursting S.D., 1998) и четыре (Susser M., 1977; 1986) уровня достижения биологического правдоподобия и согласованности с имеющимися знаниями. Рассмотрены методологии интегрирования данных из различных дисциплин путем “Байесовского анализа” (“Байесовский мета-анализ”), опирающегося на “Вес свидетельств” (“Weight of Evidence”; WoE) и телеоанализа. Последний заключается в комбинация данных из исследований разных типов для количественной оценки причинно-следственной связи между двумя такими ассоциациями, каждая из которых может быть доказана, но определить связь между причинностью первой и конечным эффектом второй – затруднительно по ряду соображений, в том числе этического плана. Подход путем телеоанализа представляется сомнительным. Несмотря на необходимость критерия “Биологическое правдоподобие”, он, как и почти все критерии Хилла (кроме “Временной зависимости”) не является ни необходимым, ни достаточным для доказательности. Приведены примеры (в том числе по воздействию радиации), показывающие, во-первых, что “Биологическое правдоподобие” зависит от текущих биологических знаний, и, во-вторых, что имеются реальные, но кажущиеся неправдоподобными ассоциации, равно как и наоборот. В том числе на этом базируется критика некоторыми авторами (A.R. Feinstein; K.J. Rothman и S. Greenland; B.G. Charlton; K. Goodman и C.V. Phillips) как конкретно критерия “Биологическое правдоподобие”, так и всего индуктивного подхода, основанного на причинных критериях. Тем не менее критерий “Биологическое правдоподобие” остается важным для доказательства причинности в эпидемиологических исследованиях, в особенности для тех дисциплин, на которые опирается общественное здравоохранение при принятии предупредительных решений и разработки нормативов безопасности.

**Ключевые слова:** критерий причинности “Биологическое правдоподобие”, вес свидетельств, интегрирование данных медико-биологических дисциплин, байесовский мета-анализ, телеоанализ

DOI: 10.31857/S0869803120050069

К настоящему моменту наш цикл сообщений в журнале “Радиационная биология. Радиоэкология”, посвященный вопросам причинности в описательных дисциплинах, в том числе радиационного профиля, расширяется с первоначально-

но намеченных трех обзоров до минимум четырех. Две публикации уже увидели свет [1, 2], а две запланированы. Они посвящены моделям каузации и изложению исторических истоков, сути, ограничениям, широте применения и радиационному аспекту руководящих принципов/критериев, по которым устанавливается причинность

<sup>#</sup> Публикуется в авторской редакции.

[1, 2]. Начиная от постулатов Генле–Коха для инфекционных патологий (J. Henle и R. Koch; 1877–1893; Германия) с их последующими усовершенствованиями и заканчивая критериями Хилла (Hill A.V., 1965; Великобритания), Сассера (Susser M., 1973; США), Эванса (Evans A.S., 1976; США) и других, менее известных ныне авторов [1, 2] (и последующие сообщения).

Материал, опубликованный по теме с начала 1950-х годов (почти полностью – США [2]), как эпидемиологического, так и научно-философского плана, включая статьи и объемные западные пособия по эпидемиологии и канцерогенезу (об использованных нами сотнях источниках и более 40 пособиях см. в [3]), настолько велик, что, помимо собственно объединяющих сообщений № 1–4, возникла необходимость в отдельных подробных публикациях по наиболее важным критериям. Два обзора по критерию “Сила связи” (“Strength of association”) [4, 5] и обзор по критерию “Временная зависимость” (“Temporality”) с изложением фактов обратной причинности [3], уже изданы. Настоящая работа посвящена еще одному критерию – “Биологическому правдоподобию” (“Biological plausibility”), ибо соответствующий материал по его объему, важности и актуальности, в том числе для экспериментальной радиобиологии, трудно отразить только отдельным фрагментом статьи.

Таким образом, обзоры [3–5] и представленный ниже – это некие детализированные преамбулы к сообщениям 3 и 4<sup>1</sup> (список примечаний идет после основного текста).

Важность рассматриваемых проблем заключается в том, что во всех описательных дисциплинах, куда кроме естественно-научных входят и ретроспективные (история), и социально-экономические, и психологические, и пр. (см. в [3, 4]), доказательность может основываться на выявлении статистически значимых ассоциаций: между причиной и следствием, между воздействием и эффектом, между характеристикой группы и ее последующими поведенческими особенностями, и т.п. В экспериментальных дисциплинах, где возможно определять условия опыта, получение подобных доказательств достаточно ясно (экспериментальным называется подход, когда можно проконтролировать хотя бы один варьирующий фактор из многих [8]). Выявление в эксперименте статистически значимой ассоциации или корреляции – это *конечный* этап доказательности [9] (что относится и к рандомизированным контролируемым испытаниям (RCT) в медицине [8, 10]). Но для описательных дисциплин ассоциация не означает причинность, какой бы статистической значимости ни была корреляция [1–7, 9–12].

Выявленная ассоциация в описательных исследованиях при отсутствии контроля над вари-

антой(ами) может объясняться следующими неучтенными факторами [13] (и др. источники; см. в [1–5]):

- случайностью (“chance”);
- вмешивающимися факторами (“третий фактор”; “confounder”; “конфаундер”);
- систематическими ошибками (bias – “смещение”);
- обратной причинностью.

Все эти факторы с многочисленными примерами были рассмотрены нами ранее [1–5] (кроме смещений, перечень которых можно найти во многих пособиях, а более трех десятков приведены в оксфордском эпидемиологическом словаре [14]).

В связи с этим для эпидемиологии установление статистически значимой ассоциации между двумя явлениями, в отличие от экспериментальных дисциплин, только самый первый, *исходный* этап доказательства причинности [9] (и др. работы; см. в [3, 4]).

Чтобы подтвердить причинность ассоциации, вслед за постулатами Генле–Коха для инфекционных заболеваний, в 1950–1970-х годах в эпидемиологии был разработан ряд “мер предосторожности” (“precautions”), пунктов (“points”) – положений (“viewpoints”) – руководящих принципов (“guidelines”) – мнений (“judgments”) – критериев (“criteria”) – постулатов (“postulate”) и др. (перечисленное по сути синонимы; источники см. в [1–3]) для оценки причинности хронических, неинфекционных патологий. Наиболее известны девять критериев причинности Хилла, восемь из которых этот авторитетный в прошлом английский статистик в области медицины только собрал воедино, взяв у других авторов [11]. Тем не менее теперь критерии причинности в эпидемиологии [1–5, 14] и даже в экоэпидемиологии [7, 15, 16] называются почти всегда “критериями Хилла” или “руководящими принципами Хилла”.

Сам Хилл подчеркивал, что, за исключением “Временной зависимости” (воздействие должно быть перед эффектом) [3] это не строгие правила-критерии, а некие принципы, руководства, чтобы оценить степень вероятности того, что ассоциация причинна (“viewpoints”) [11].

Согласно анализу авторитетных авторов (Weed D.L., Gorelic L.S., 1996 [17]<sup>2</sup> и др.), а также данным нашего исследования публикаций 2013–2019 гг. (подробнее эти материалы запланировано рассмотреть в сообщениях 3 и 4), некоторые критерии представляются наиболее важными и используются чаще. Поэтому вслед, как уже говорилось, за названными обзорами-преамбулами [3–5], посвященными двум основным критериям, в настоящей работе рассмотрен третий из них – “Биологическое правдоподобие”.

## ИСТОРИЯ КРИТЕРИЯ “BIOLOGICAL PLAUSIBILITY”. ПЕРЕКРЫВАНИЕ СМЫСЛОВ С “COHERENCE”

Впервые подходящий пункт, названный тогда “постулатом”, появляется в работе Wynder E.L., 1956 [18], содержащей правила установления причинности рака: “Для агента должна быть показана канцерогенность на некоторых видах животных (не обязателен)”<sup>3</sup>. Но в Wynder E.L., Day E., 1961 [19], когда постулаты оказались расширенными до всех хронических патологий, указанный пункт из перечня был убран, т.е. автор как бы перемал.

Однако А.М. Lilienfeld в 1957 г. [20] развил данное положение. Был введен и сам термин: “Biological plausibility [of a causal hypothesis]”. Обеспечивалось положение экспериментами на животных и имело градации величины. Затем, в Lilienfeld A.M., 1959 [21], было сказано о “биологическом правдоподобии ассоциации, которое зависит от нашего основного знания биологии этих специфических патологий”<sup>4</sup>.

В 1960 г. Р.Е. Sartwell [22] среди своих пяти “пунктов” (points), после силы ассоциации, ее воспроизводимости, собственно коррелятивной связи (почему-то на третьем месте), временной зависимости (почему-то на четвертом месте) последним назвал “Биологическую обоснованность ассоциации” (“The Biologic reasonableness [of the association]”). Обдумывание логического порядка пунктов, вероятно, не было целью краткой статьи Sartwell Р.Е., 1960 [22]; важен был только их смысл.

В Сообщении Главного врача США о последствиях курения от 1964 г. [23]<sup>5</sup> данного пункта нет, он заменялся “Coherence” – согласованностью с известными фактами природной истории и биологии заболевания. Видно, что этот пункт почти буквально совпадает с “Biological plausibility” от Lilienfeld A.M., 1959 [21].

В 1965 г. А.В. Hill [11] добавил к “Biological plausibility”, вероятно, из работ Lilienfeld A.M., 1957; 1959 [20, 21], пункт “Coherence”, вероятно, из Сообщения 1964 г. [23] (ссылки в [11] ни на кого нет [2]). При этом первый критерий у Хилла получил несколько иной смысл, а именно собственно правдоподобие зависимости в широком биологическом смысле (не только применительно к конкретной патологии).

М. Susser, по крайней мере с 1977 г. [25]<sup>6</sup>, развивал критерий “Coherence”, по сути включающий “Биологическое правдоподобие”.

В широко цитируемом пособии “Pharmacoepidemiology” (издание от 2000 г.) “Coherence” и “Biological plausibility” также полностью совпадают [27].

Таким образом, критерий “Coherence” в ряде источников вытеснил “Biological plausibility”. От-

метим к тому же, что смысл “Биологического правдоподобия” порой совпадает с тем, что понимают ныне и под критерием “Эксперимент” [16, 27].

В модифицированных для экоэпидемиологии критериях Хилла “Biological plausibility” и “Coherence” заменены на “Biological concordance” (“Биологическая согласованность”) [16].

По данным упомянутого исследования Weed D.L., Gorelic L.S., 1996 [17], среди 14 обзоров на тему критерий “Biological plausibility” упоминался в восьми источниках (четвертое место среди девяти критериев). В нашем анализе публикаций за 2013–2019 гг. (35 работ, в которых критерий Хилла использовались как методология) это положение по применению находилось на третьем месте (на первом – “Strength of association”, а на втором, с одинаковыми результатами, – “Temporality”, “Consistency” и “Biological gradient”, т.е. зависимость “доза–эффект”).

## СУЩНОСТЬ КРИТЕРИЯ – ИНТЕГРАЦИЯ ДАННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ДИСЦИПЛИН

Тема внедрения в эпидемиологические доказательства данных из биологии, медицины (“биомедицинские знания” [28]), токсикологии, фармакологии, экологии и иных дисциплин [2, 11, 15, 16, 23–59]<sup>7</sup>, равно как и обратный подход – проверка биологических фактов эпидемиологическими закономерностями (есть и такое) [52], весьма широка и, действительно, заслуживает отдельного обзора, который и был выполнен до нас, но уже давно (Weed D.L., Hursting S.D., 1998 [29]).

“Эпидемиология, молекулярная патология (в том числе химия, биохимия, молекулярная биология, молекулярная вирусология, молекулярная генетика, эпигенетика, геномика, протеомика и другие молекулярные подходы), а также эксперименты на животных и клетках *in vitro*, должны рассматриваться как важная интеграция доказательств в определение канцерогенных эффектов для человека” (Институт рака США, 2012) [53]<sup>8</sup>. Из первого абзаца можно добавить сюда медицину, токсикологию, фармакологию и экологию.

Приведенный список показывает, что данные из почти любой сферы медико-биологических и молекулярно-клеточных дисциплин могут внести важный вклад в поиск доказательств для эпидемиологических изысканий какой угодно практической значимости. Это, ясно, придает практическую значимость и самим исследованиям любой кажущейся фундаментальности и теоретичности.

Суть критерия в целом понятна; он многословно, но размыто, объяснен в массе работ (“Для этого критерия нет четкого правила” [51]). Вероятно поэтому имеющийся материал похож, порой, просто на “поток сознания” [29, 54, 60, 61] (и др.)<sup>9</sup>. Такой материал нелегко систематизиро-

вать и рубрифицировать по смыслам и уровням значимости.

*Соответствие общенаучным знаниям.* Последние включают научные факты и законы, которые имеют отношение к предполагаемой причинно-следственной связи (general scientific) [55]. Критерий относится к научному правдоподобию ассоциации [43].

*Поддержка лабораторными экспериментами in vitro и на животных* [27, 62, 63]. Возникает вопрос, насколько модели, полученные для клеток и животных, применимы к людям? Если эффект наблюдается у крыс или обезьян, то откуда известно, что он будет у людей? И наоборот, только потому, что эффект не обнаруживается у животных, следует ли отсюда, что он не может возникнуть у людей? [62] (ниже приведен именно такой плачевный пример с приемом талидомида беременными).

“Несмотря на эти неопределенности, опыт показал, что доказательства на животных могут иметь значение, и там, где они существуют, их следует принимать во внимание” (пособие 2019 г.) [62]<sup>10</sup>. К примеру, было обнаружено, что тератогены для человека также являются тератогенами по меньшей мере для одного вида животных и демонстрируют некоторую токсичность для большинства протестированных видов. Хотя, как правило, экстраполяция эффектов между видами требует знания их физиологии [15] (вопросы применимости лабораторного подхода, в рамках критерия “Эксперимент”, намечено рассмотреть в других наших работах).

*Наличие биологических и социальных моделей, механизмов, объясняющих связь* [13, 34, 38, 62, 64, 65]. Рассматриваются на разных уровнях биологической и социальной организации, от молекулярно-клеточного до популяционного (например, на уровне поведенческих реакций, способствующих канцерогенности фактора – “социальное”) [29]. “Причинно-следственная связь считается биологически правдоподобной, когда в научной литературе обнаружены доказательства вероятного причинно-следственного механизма” [66]<sup>11</sup> (исходя из [66] возникает мысль, что для подтверждения не обязательно проводить эксперименты; достаточно и синтетических исследований). Т. Hartung в 2007 г. назвал это “механистическим подтверждением” (“mechanistic validation”; см. в Hartung T. et al., 2013 [56]).

Биологическое правдоподобие отражает согласование/несогласование теории, объясняющей, как или почему воздействие вызывает заболевание, с другими известными механизмами причинности этого заболевания [31]. Например, показано ли, что агент или метаболит вообще достигает целевого органа? [67]. “Научная или патофизиологическая теория” [27]. “Биологический

здоровый смысл” (common sense) [15]. “В медицине принято начинать исследование состояния, например редкой врожденной болезни, с наблюдений и эпидемиологических данных, а заканчивать изучением механизмов ее наследования и сущности “поломки” метаболизма” [24].

Международные и национальные агентства сформировали списки соединений и воздействий, которые считаются канцерогенными для человека. Критериями служат, помимо собственно эпидемиологических исследований, данные экспериментов на животных и представления о механизмах. Хотя только данные о механизме редко можно считать адекватными для установления канцерогенности агента применительно к человеку, несмотря на все успехи в понимании молекулярных основ этого процесса [47] и на все “предупредительные принципы” [1]. Согласно [68], для заключения о причинности, помимо наличия правдоподобного механизма, необходимы, все же, эпидемиологические данные о частоте эффекта. Равным образом, в обзоре [54] указывается, что для установления причинно-следственных связей нужна взаимная поддержка механизмов и зависимостей. Этот же принцип исповедует и Международное агентство по исследованию рака (МАИР; IARC) для канцерогенных факторов: оценка причинности зависит от наличия правдоподобного механизма и вероятностных данных, т.е. от увеличения частоты рака у населения или от относительного риска [54, 57]<sup>12</sup>.

*Три уровня достижения биологического правдоподобия по D.L. Weed.* Названы в тематическом обзоре Weed D.L., Hursting S.D, 1998 [29] (см. также в Weed D.L., 2004 [51]):

1) когда для ассоциации можно предположить разумный механизм, но никаких биологических доказательств не существует (начало положено, согласно [29], в Hill A.V., 1965 [11]; повторено последующими авторами, к примеру [13]);

2) когда к механизму можно добавить факты из области молекулярной биологии и молекулярной эпидемиологии (дополним: в том числе данные о “суррогатных EndPoints”, т.е. биомаркерах [7]). В [29] в качестве иллюстрации приводится монография МАИР от 1990 г., но сходные построения есть и в более поздних документах этой организации. Особое внимание уделяется молекулярно-клеточным показателям: аддуктам и повреждению ДНК, их репарации, нарушениям пролиферации, уровню клеточной гибели, изменениям межклеточных связей и пр. (IARC-2006) [57];

3) если имеется достаточно доказательств того, как причинный фактор влияет на известный механизм патологии [69, 70]. Это наиболее строгий из трех подходов к биологическому правдоподобию [29]. В Weed D.L., 2000 [39] указывается, что, хотя трудно предложить эмпирическое правило

для определения биологического правдоподобия, тем не менее, если представляющий интерес фактор является ключевым в биологическом механизме или на его проводящих путях (pathways), то более вероятно, что зависимость будет причинной. Механизмы или пути демонстрируются с помощью лабораторных экспериментов и молекулярной эпидемиологии [39].

Применительно к этим трем уровням в Weed D.L., Hursting S.D, 1998 [29] развиваются схоластические рассуждения, не лишённые теоретического смысла, но трудно переводимые в практику. Указывается, что неясно, сколько свидетельств и какие свидетельства превратят “предполагаемый” (A.V. Hill и др. авторы) [11, 13] или “гипотетический” (M. Susser) [71] в “согласованный” (coherence) механизм (Сообщение Главного врача США о последствиях курения от 1964 г.) [23], т.е. тот, который не только “имеет смысл” [72]<sup>13</sup>, но и “определен... нашим детальным пониманием каждого шага в цепочке событий” [23]. Встает также вопрос: что требуется для утверждения, что мы “знаем” механизм [69, 70]? Ведь объяснение (т.е. механизм) понимается в широком смысле, поскольку трудно определить, “что такое хорошее объяснение” и как проводить учет “успешности” механизмов [54].

В конечном счете все это вопрос суждения: достаточно ли собрано свидетельств, чтобы исключить альтернативные объяснения (“Вес свидетельств”; “Weight of Evidence”; WoE [16, 34, 38, 40, 54, 56, 67]) [30]. В свое время Комитет по диете и здоровью Комиссии по естественным наукам США (The Committee on Diet and Health of the National Research Council’s Commission on Life Sciences) для комплекса из шести критериев Хилла (сила ассоциации, дозовая зависимость, временная зависимость, постоянство ассоциации, специфичность и биологическое правдоподобие) придал равный вес всем критериям, кроме правдоподобия, значение которого было снижено, поскольку это положение “зависит от субъективной интерпретации” [73]. И позже: “Очень субъективно” [74].

*Четыре уровня достижения биологического правдоподобия по M. Susser.* Этот автор, как сказано, развивал понятие о критерии “Coherence”, включающем “Биологическое правдоподобие”, с 1977 г. [25] (если не ранее; см. прим. 6), а в 1986 г. [36, 37] изложил свои понятия подробно. Критерий отражает ранее существовавшие теорию и знания (это как раз “Coherence” иных авторов [11, 23]) и трактуется широко, включая следующие элементы согласованности: 1) с теоретическим правдоподобием (названо также в [54]), 2) с фактами, 3) с биологическими знаниями (т.е. “Биологическое правдоподобие”) и 4) со статистическими закономерностями, включающими зави-

симость “доза–эффект” (подробнее комплекс критериев M. Susser запланировано рассмотреть в Сообщении 4).

### ВАЖНОСТЬ ИНТЕГРАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ДИСЦИПЛИН С ЭПИДЕМИОЛОГИЕЙ (РАДИАЦИОННОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЕЙ): ЦИТАТЫ

Уместно привести цитаты, преимущественно из весомых источников, отражающие названное положение. Они могут быть полезны экспериментаторам для обоснований (для этого в “Примечании” представлены также и англоязычные оригиналы).

“Продвижение в биологических науках и их интеграция в здравоохранение через молекулярную эпидемиологию делают один причинный критерий, “Биологическое правдоподобие” (иногда называемый “Биологической согласованностью”), все более и более важным соображением в причинном выводе” (1998) [29]<sup>14</sup>.

“Биологическое правдоподобие представляет фундаментальные концепции интеграции данных – критерий предполагает, что эпидемиология и биология должны взаимодействовать” (2015) [34]<sup>15</sup>.

“Связи и данные должны иметь биологический и эпидемиологический смысл” (1983) [75]<sup>16</sup>. “Причинно-следственная связь должна иметь биологический смысл” (2016) [33]<sup>17</sup>.

“Биологическое правдоподобие – это [критерий], где биология и эпидемиология сливаются” (2016) [46]<sup>18</sup>.

“Демонстрация биологического правдоподобия не входит в эпидемиологические методы. Это, однако, не означает, что эпидемиологи могут забыть о нем. Эпидемиологи должны понимать биологию болезней, которые они изучают, объяснять свои гипотезы в биологических терминах, предлагать и продвигать (иногда даже проводить) биологические исследования для проверки гипотез” (2016) [33]<sup>19</sup>.

“В конечном счете, биологические процессы регулируют все патологии и неблагоприятные последствия для здоровья без исключения. Это относится и к социальным и физиологическим процессам, так что вредные эффекты экономических потерь должны, в конечном счете, осуществляться через биологию” (2016) [33]<sup>20</sup>.

“Интеграция сведений относится к объединению данных, знаний или рассуждений из разных дисциплин или от разных подходов с целью генерирования уровня понимания или знания, которого ни одна дисциплина не достигла в одиночку” (2015) [34]<sup>21</sup>.

“Сегодня исследователи, рассматривающие причинный вывод, должны объединить данные от разнообразных научных дисциплин” (2015) [34]<sup>22</sup>.

“Медицинский прогресс лучше развивается, когда дисциплины, которые сосредотачиваются на субклеточных и молекулярных фундаментальных исследованиях, действуют в тандеме с эпидемиологией” (2003) [31]<sup>23</sup>.

В судебной системе США заключение о причинно-следственных связях по делам о токсических правонарушениях выносится иной раз с учетом “широкого разнообразия доказательств различной научной ценности: из эпидемиологии, исследований на животных, химических аналогий, сообщений о случаях заболевания, нормативных правил и других вторичных источников” (2004) [32]<sup>24</sup>. Хотя эпидемиологии придается первостепенное значение (см. в [4]).

Руководство для анализа веса свидетельств (WoE; источники см. выше), применяемое при выполнении Международной программы по химической безопасности (ВОЗ; токсикология, химия, окружающая среда, включая биоту) для оценки воздействия агентов, включает модифицированные критерии Хилла, причем “Биологическое правдоподобие” стоит первым (2017) [40]. Дело в том, что агентства по охране окружающей среды, в частности USEPA, формируют свои заключения, порой, только на основе опытов на животных [31].

Интеграция данных касается и дисциплин радиационного профиля:

“Эксперты по радиационной защите, как законодатели, так и практикующие специалисты, поддерживают понимание нынешних знаний в области радиобиологии и эпидемиологии, чтобы подкреплять соответствующие решения” (2009) [76]<sup>25</sup>.

“Когда эпидемиология достигает своих пределов, она зовет радиобиологию на помощь!” (2000) [77]<sup>26</sup>.

“Тандем радиационной эпидемиологии и радиобиологии для практики радиационной защиты” (2010) [78].

“Интеграция фундаментальной радиобиологии и эпидемиологических исследований: почему и как”. “Большое значение придается использованию основных данных радиобиологии при разработке [методов] оценки радиационного риска” (2015) [79]<sup>27</sup>.

Смысл представленного материала ясен, если вспомнить, что эпидемиология сама по себе, и все описательные дисциплины, это почти только установленные ассоциации [1–5, 78]. В результате появляются факты приведенных ранее абсурдных, статистически значимых прямых или обратных связей между потреблением морожено-

го и смертностью от утопления [1], между экспортом лимонов в США и количеством там автоаварий [3], между линейным размером пениса у мужского населения страны и уровнем в ней валового внутреннего продукта (ВВП) [80]<sup>28</sup>. Представляющиеся на первый взгляд более реальными связи из медицины и эпидемиологии могут таковыми только казаться, поскольку абсурд, возможно, просто более скрыт и сложен.

Как указано для “Биологического правдоподобия” в пособии Власов В.В., 2006 [24]: “Фактически этот признак – вариант признака “объяснимость связи””.

Наверное, такое определение – самое краткое и точное. Им следует руководствоваться и в обычной жизни: при всех исключениях немного вероятности, что абсурдная и необъяснимая связь окажется истинной, а истинная связь будет необъяснимой.

## БАЙЕСОВСКИЙ АНАЛИЗ (МЕТА-АНАЛИЗ)

Основанный на интеграции данных из разных дисциплин систематический подход в ряде работ относят к “Байесовскому анализу” [31] = Confidence Profile Method = Bayesian method [81, 82], иногда – к “Байесовскому мета-анализу” [82–84]<sup>29</sup>. Он опирается на вес свидетельств (доказательств), а не на одно конкретное исследование, следуя тем же принципам, что и принятие решений по Байесу [31, 81–84]. Метод предусматривает включение всех доступных медико-биологических данных – от отчетов о случаях заболевания до исследований на животных – в одну обновляемую и стандартизованную оценку, которая определяет общую силу причинной обусловленности (см. в [31]).

Согласно авторам из США [31], в повседневной практике большинство врачей используют байесовский анализ в сочетании с индуктивными рассуждениями – практика, известная как постановка дифференциального диагноза.

## ТЕЛЕОАНАЛИЗ: СОМНИТЕЛЬНАЯ СМЫЧКА ЗНАНИЙ

Если мета- и pooled-анализы используются в широком спектре дисциплин [85] (и мн. др.), то с термином “телеоанализ” (“Teleoanalysis”) вряд ли многие даже встречались. В PubMed на это слово извлекается три источника, и первый из них, Wald N.J., Morris J.K., 2003 [86], является основополагающим. Авторы [86] благодарят Jeffrey Aronson, который предложил сам термин (от “teleos”, что означает “complete” – “законченный”). Буквальный смысл – комбинация данных из *различных* типов исследований [86]. Отличие от мета- и pooled-анализа состоит в том, что комбинируют-

ся данные из *разных* классов доказательств. Цель: осуществить смычку, *причем количественно*, в плане конечной причинно-следственной связи между двумя такими ассоциациями, каждая из которых может быть доказана, но определить связь между причинностью первой и конечным эффектом второй — затруднительно по ряду соображений, в том числе этического плана (опыты на людях).

В [86] приводится следующий пример. Известно, что потребление насыщенных жиров увеличивает риск ишемической болезни сердца, но величина эффекта не может быть установлена экспериментально, поскольку длительные испытания на основе диетических привычек трудны на практике (*impractical*). Предлагается для оценки общей величины эффекта решить проблему путем объединения данных, используя концентрацию холестерина в качестве промежуточного фактора в причинном пути. Исследуется: а) влияние снижения потребления жиров на концентрацию холестерина в сыворотке (это может быть выполнено в небольших экспериментальных исследованиях); б) влияние концентрации холестерина на риск ишемической болезни сердца (что можно сделать в эпидемиологических исследованиях). Затем названные данные согласуются количественно для оценки влияния жиров в диете на патологию.

Подход методом телеанализа, насколько можно судить, не слишком распространен. Помимо работы [86], термин встретился нам еще в трех публикациях (одну PubMed не идентифицировал) [87–89]. Применение, в основном для исследования эффекта препаратов, обнаружено только в [86], хотя сходный подход (без термина) имеется в работах по оценке токсичности соединений для человека (см., например, [34]). Но заметим, что телеанализ, как было видно, отличается от простой интеграции данных для выявления биологического правдоподобия тем, что является *количественной* оценкой. Стыкующей две отдельных ассоциации, что сомнительно. Никто не может знать, какие количественные биологические закономерности на уровне *in vivo* будут там, где их невозможно или трудно определить. Представляется надуманным и даже отчасти нефальсифицируемым вывод, что такая-то *количественно* диета через концентрацию холестерина будет приводить к такой-то *количественно* частоте ишемической болезни сердца, без прямого исследования связи диета—патология, поскольку вероятно влияние конфаундеров.

Так, в работе [90] приводится условный пример причинной цепочки событий, состоящей из пяти звеньев-связей, каждая из которых характеризуется вероятностью в 90%. В таком случае вероятность общей связи, от первого до последнего

звена, будет равна  $0.9^5 = 0.59$  или 59%. А если мы представим себе 75% вероятности (тоже немало), то будем иметь на выходе всего 24%. Интересно знать, что в подобном случае останется от телеанализа связи между диетой и ишемической болезнью сердца.

Наверное, такой подход оправдан только для “предупредительного принципа” [1, 51], когда необходимы хоть какие-то цифры для принятия решений.

Зато идеологически методика телеанализа может позволять разные спекуляции по стыковке доработанных и ясных фрагментов в целом недодоработанных и неясных исследований. И термин выглядит солидно, как мета- и pooled-анализ и как “говорить прозой” у Мольера.

### НЕАБСОЛЮТНОСТЬ КРИТЕРИЯ: ЧТО БИОЛОГИЧЕСКИ ПРАВДОПОДОБНО — ЗАВИСИТ ОТ ТЕКУЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЗНАНИЙ

Это высказывание Хилла от 1965 г. [11] (“What is biologically plausible depends upon the biological knowledge of the day”) нередко рассматривается, похоже, как оригинальная мысль [28, 29, 49, 87, 91], но ее можно найти уже в работах предыдущих исследователей.

В публикации Lilienfeld A.M., 1957 [20] сказано:

“а) Существуют исторические примеры, когда статистическая ассоциация исходно не соответствовала текущим биологическим концепциям. Продвижение знания изменяло концепции, которые оказывались уже соответствующими ранее выявленным ассоциациям.

б) Напротив, имеются примеры, когда ассоциация интерпретировалась как согласующаяся с существующими биологическими концепциями, но более поздняя интерпретация ассоциации выявляла ошибку”<sup>30</sup>.

Сходные положения высказаны и в статье Lilienfeld A.M., 1959 [21] со ссылкой на предыдущую статью 1957 г. [20]:

“...интерпретация каких-либо связей ограничена нашими биологическими знаниями, и вполне может быть, что ассоциация, которая в настоящее время не представляется биологически правдоподобной, окажется таковой, когда наши знания будут расширены”<sup>31</sup>.

В 1960 г. P.E. Sartwell [22] про свой пункт “Биологическая обоснованность (reasonableness) ассоциации” отмечал, что с этим положением надо быть осторожным, поскольку суждения, сделанные на его основе, подкреплены несовершенным знанием, существующим в конкретное время<sup>32</sup>.

И после Хилла можно найти повторение этого тезиса в весомых источниках (1991–2018) [15, 30,

43, 50, 67, 92]. В очередной раз отметим опасность ситуации: есть вероятность, что продекларированные кем-то некорректные и абсурдные ассоциации, а также такие же данные, могут быть оправданы тем, что “еще не наступило их время; наука пока не знает”.

Представляют интерес исторические примеры, иллюстрирующие два приведенных пункта А.М. Lilienfeld (1957; 1959) [20, 21]:

- Галантерейщик John Graunt исследовал в 1662 г. факторы риска чумы в Лондоне. Все четыре его совета (избегать “зараженного воздуха, привезенного судами в порту”, скученности, контакта с животными и больными) оказались конструктивными, несмотря на отсутствие каких-либо биологических теорий [48, 93].

- Чрезвычайное учащение рака мошонки у английских трубочистов было выявлено Percival Pott в 1776 г. [11, 15, 48, 93], за 150 лет до начала исследований химических канцерогенов. Однако уже после работы Р. Pott датский парламент издал указ о “профилактике”: трубочистам предписывалось мыться каждый день [15].

- В 1842 г. Domenico Rigoni-Stern, проанализировав статистические данные для Вероны, обнаружил, что смертность от рака шейки матки была характерна для замужних, а не для одиноких женщин, что указывало на влияние сексуальной или репродуктивной активности. Факт был забыт вплоть до начала 1950-х годов, когда отметили редкость названной патологии среди католических монахинь. В 1960-х годах проводился поиск связанного с сексуальным поведением болезнетворного фактора, и в 1970-х годах в качестве такового назвали вирус герпеса (HSV II), что в тот период расценивалось как биологически правдоподобная гипотеза. Но последующие эпидемиологические исследования не подтвердили связи. В 1980-х годах, с развитием метода ДНК-гибридизации, истинный фактор был открыт. Им оказался папилломавирус человека (HPV), хотя и специфических генетических подтипов [70]. Автор обзора [70] отмечает, что трудно представить, как бы было получено доказательство без “плодотворного пересечения эпидемиологических и биологических подходов”.

- В 1848–1849 гг. William Farr выявил обратную ассоциацию между высотой проживания выше уровня моря и смертностью от холеры в Лондоне [94]. Феномен соответствовал господствующей в то время теории “миазмов” и был истолкован как правдоподобный. Позже обнаружилось, что и согласно микробной теории ситуация такая же: высота источников воды оказалась в обратной связи с этиологическим фактором (в публикациях на тему пример приведен в Lilienfeld А.М., 1957 [20]).

- В 1849–1854 гг. John Snow идентифицировал в Лондоне связь между загрязнением питьевой

воды и заболеваемостью холерой [95]. Выводы J. Snow не представлялись биологически правдоподобными в свете теории “миазмов”. Однако, когда микробная теория стала общепринятой, связь между загрязнением воды и холерой стала научно обоснованной (в публикациях на тему исходно пример приведен в Lilienfeld А.М., 1957 [20]; повторен позже в [11, 68, 96, 97]).

- В 1861 г. David W. Cheever (США), предупреждая об опасности “бессмысленных корреляций”, указывал, что было бы смешно приписывать тиф, которым заразился некто, проводя ночь на эмигрантском судне, паразитам на телах больных. Это, мол, просто совпадение [98] (в публикациях на тему исходно пример приведен в Sartwell Р.Е., 1960 [22]; повторен позже Хиллом [11], а затем К.Ж. Rothman и S. Greenland [43, 45, 99]).

- На заре исследования СПИДа его причины связали с употреблением гомосексуалистами амилнитритов (“попперсов”; вдыхание их увеличивает, скажем так, временный темперамент) [100].

Это наиболее популярные примеры (кроме второго и последнего) относительно временной конъюнктуры правдоподобия, которые приводятся в пособиях по эпидемиологии и обзорах. Но можно вспомнить еще случаи из истории медицины, хотя бы с терапией всех болезней кровопусканием или с выпиванием Максом Петтенкофером (Max von Pettenkofer) живой культуры холерного вибриона, причем — без последствий. Что “подтвердило” гигиеническую теорию “миазмов” [101].

Весьма эволюционировали понятия о биологическом правдоподобии и в области радиационной эпидемиологии, и радиобиологии. На рис. 1 представлено развитие мировых норм радиационной безопасности (НРБ) по материалам из [102].

Уменьшение допустимой дозы на два порядка за менее чем 70 лет вполне иллюстрирует эволюцию представлений о биологическом правдоподобии действия радиации. Вначале использовались понятия “толерантная доза” (до 1942 г.), а затем — “максимально допустимое воздействие” (до 1950 г.), означающие нечто “безвредное”. В 1950 г. произошла смена концепции на вред облучения при любой дозе, с последующим снижением стандарта дозы настолько, насколько это “разумно достижимо” [102].

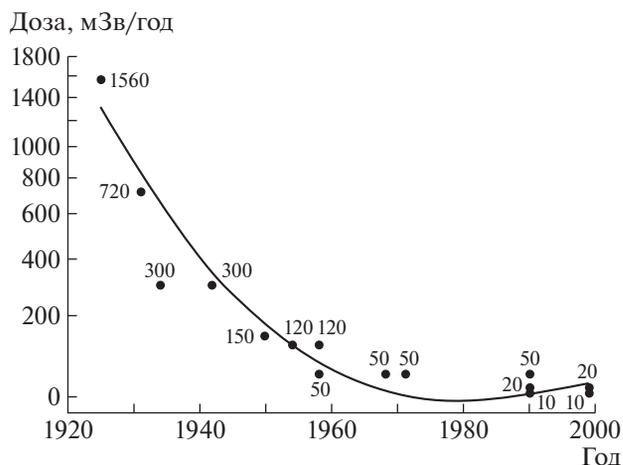
Пока господствовала концепция пороговой безвредности излучения (отметим, что тот “порог” был весьма велик), представления о его эффектах носили, на современный взгляд, анекдотичный характер. Рентгенологи времен Первой мировой войны просвечивали грудную клетку пациента, стоя прямо за его спиной и держа рентгеновскую пленку в руках [104].

“Полезная для здоровья” радиевая вода “Radithor” (2 мкКи в 16,5 мл на бутылочку; пополам  $^{226}\text{Ra}$  и  $^{228}\text{Ra}$  [105, 106]), которой к 1932 г. опился до смерти известная знаменитость Eben M. Byers (предприниматель и гольфист) [105–108]<sup>33</sup>, а также ректальные свечи с радием (1930), которые “заряжают как батарейка”<sup>34</sup> [114, 115] (вспоминается реклама “Energizer” с зайцами), не самые одиозные примеры. Популярны во Франции в 1930-х годах кремы для лица и другой парфюм под брендом “Tho-Radia”, “обогащенные торием и радием”, равно как и такая же зубная паста “Doramad” в Германии [105, 116], хотя и удивляют, но после всего в те времена – не слишком. Радий тогда добавляли всюду: и в шоколадки, и в капли для глаз, и в елочные игрушки, и в детские книжки со светящимися буквами. Широко использовалось нечто вроде сифонов для обогащения питьевой воды радием. Масса таких примеров приведена в пособии по радиационной экологии Г.Н. Белозерского от 2019 г. [116], а фото всех этих чудес можно найти в русско- и англоязычных блогах Интернета.

Но наиболее впечатляет относительно поздняя детская игра-конструктор 1950–1951 гг. “Gilbert U-238 Atomic Energy Lab” (есть и другие похожие игры), с призывами типа “Собери себе атомную электростанцию, дружок!” (“Покажет тебе реальный атомный распад радиоактивного материала!”<sup>35</sup> [117]). В коробку с игрой, помимо электроскопа и пр., входили емкости с четырьмя типами урановых руд, равно как с  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{106}\text{Ru}$ ,  $^{65}\text{Zn}$  и  $^{210}\text{Po}$  [117].

Наглядна также эволюция представлений о наследственных генетических изменениях у людей после радиационного воздействия (т.е. о дефектах, патологиях и отклонениях у необлученных детей облученных родителей). Таковые изменения были обнаружены сначала у дрозофилы (1927), а потом у мышей и др. животных (1950-е годы) [118, 119]. И мир замер в ожидании массы радиационных мутантов у людей как результатов испытания ядерного оружия, радиоактивного загрязнения окружающей среды от атомной энергетики, прогрессивного использования излучения в медицине и пр. Все это отразилось на СМИ, кино и фантастической литературе 1960–1970-х годах, где фигурировали ужасные мутанты с невероятными способностями (позже – и на компьютерных играх) [119].

Проходило время, мутанты не нарождались даже у пострадавших в Хиросиме и Нагасаки, а также у десятков тысяч выживших после радиотерапии. Наконец, сделали заключение, что наследственные генетические эффекты у облученных людей в реальных исследованиях выявить невозможно, настолько мал даже теоретический прирост к естественному мутационному фону



**Рис. 1.** Эволюция НРБ. Построено (Statistica, ver. 10) по данным U.S. Department of Energy (DOE-1995) [102], в сокращении. Для 1958, 1990 и 1999 г. приведены НРБ для персонала и населения; для 1990 г. – НРБ от BEIR-V (50 мЗв) и МКРЗ (20 и 10 мЗв). Дополнено НРБ-99 (Россия). Исходные дозы в [101] были представлены в рэм/год (rem – roentgen equivalent man; 1 рэм = 0.01 Зв [103]). Значения стандартов доз отображены на графике.

**Fig. 1.** The evolution of radiation protection standards (RPS). Plotted (Statistica, ver. 10) according to U.S. Department of Energy (DOE-1995) [102], in abbreviation. For 1958, 1990, and 1999, RPS is presented for nuclear workers and public; for 1990 standards is presented from BEIR-V (50 mSv) and ICRP (20 and 10 mSv). Supplemented by RPS-99 (Russia). The initial doses in [101] were presented in rem/year (rem – roentgen equivalent man; 1 rem = 0.01 Sv [103]). The values of dose standards are displayed on the graph.

при любых сколь-либо правдоподобных дозах, не устраняющих фертильность. И если в настоящее время некто обнаруживает радиационных мутантов у человека, то это не отвечает критерию правдоподобия (точнее – согласованности с имеющимися данными эпидемиологии), равно как и положениям НКДАР, МКРЗ и BEIR [8, 118–122].

Правда, в недавнее время появились данные отечественных авторов, согласно которым на уровне микросателлитных полиморфизмов, генных экзонів и гетероплазмии мтДНК такая возможность для больших доз (2–3 Гр) облучения за короткий срок до зачатия (работники ПО “Маяк”), судя по всему, показана [123, 124]<sup>36</sup>. Однако в других пилотных исследованиях, группы А.В. Рубановича (Kuzmina N.S. et al., 2014; 2016 [125, 126]), не было выявлено трансгенерационной передачи даже эпигенетических изменений (гиперметилирования CpG-островков в промоторах ряда генов) потомкам ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и работников ядерной индустрии, что укладывается в общую картину. При этом для самого родительского контингента, включая еще и работников ПО “Маяк”, зависи-

мые от радиационного воздействия и от возраста названные эпигенетические изменения выявлялись отчетливо [125–127]<sup>37</sup>.

Таким образом, влияние временной конъюнктуры на биологическое правдоподобие налицо для многих дисциплин. Тем не менее, согласно правилу Дауберта [4, 31, 32]<sup>38</sup>, показания эксперта в судах США должны оцениваться на основе только текущих научных знаний, а не на возможности, что в будущем могут появиться дополнительные сведения. Никаких догадок относительно того, что смогут показать новые открытия, не допускается: “Зал суда не является местом для научной догадки, даже как вдохновения. Закон отстает от науки, а не ведет ее” [32]<sup>39</sup>.

### НЕАБСОЛЮТНОСТЬ КРИТЕРИЯ: РЕАЛЬНЫЕ, НО НЕПРАВДОПОДОБНЫЕ АССОЦИИ; ПРАВДОПОДОБНЫЕ, НО НЕ РЕАЛЬНЫЕ АССОЦИИ

Ранее нами приводились примеры эффектов конфаундеров [1, 4], случайностей и обратной причинности [3] в формировании ассоциаций. Зависимости типа “потребление мороженого – частота утоплений”, связь между алкоголизмом и раком легкого, между курением и циррозом печени, между употреблением амилнитритов и заболеваемостью СПИДом, между отказом от курения и учащением пневмоний и рака легкого, а также другие рассмотренные связи – все это примеры первой части заголовка: ассоциации как бы реальны, но их биологическое (а иной раз и логическое) правдоподобие отсутствует.

Можно добавить еще аналогичных фактов.

1. Известна плачевная ситуация с талидомидом, который не являлся тератогеном для большинства экспериментальных животных, но в 40% случаев был тератогеном при приеме его беременными, обуславливая такие тяжелые патологии, как недоразвитие конечностей и др. (сообщение 1961 г.) [93, 128].

2. Вторая трагедия (как выразились авторы [129] – “интеллектуальная патология” медиков) связана с довольно длительно применявшейся (1942–1954 гг.) оксигенацией для недоношенных детей (высокодозовая кислородная терапия). Хотя биологические основания и правдоподобный механизм были вполне понятны, никто не мог предвидеть последствий – ретролентальной фиброплазии (retrolental fibroplasia; разрастание соединительной ткани под хрусталиком), приводящей к слепоте [35, 129]. Процедура ослепила порядка 10000 детей. Доказательства причинности были получены с трудом, поскольку исходно предполагалось неонатальное происхождение дефекта. Обнаруживались также ассоциации с аномалиями плода, множественными гестациями,

материнскими инфекциями, светом, обеспеченностью витаминами и железом, дефицитом витамина Е и гипoadrenalизмом. К тому же в экспериментах на животных не было получено данных, подтверждающих соответствующий эффект и гипоксии, и гипоксии. Но со временем и когортное исследование показало, что дефект развивается у детей с исходно нормальными глазами, и контрафактический эксперимент, заключающийся в отмене воздействия (о концепции см. в [1, 11] и др.), который привел к резкому снижению названной ятрогенной эпидемии, продемонстрировали реальность связи (однако с отменой оксигенации наблюдалось увеличение смертности недоношенных младенцев от респираторного дистресс-синдрома) [129]<sup>40</sup>.

3. Рекомендация доктора Б.М. Спока (B.M. Spock) класть младенцев спать ничком для снижения риска синдрома внезапной детской смерти основана на правдоподобном объяснении, что это предохранит от удушения рвотой. Оказалось, однако, что смертность в положении на спине была вдвое ниже по сравнению с другими позами [33, 90].

В целом ряде случаев результаты рандомизированных контролируемых испытаний (RCT) кардинально противоречили данным множества эпидемиологических исследований, значимо и систематически выявляющих те или иные ассоциации, к тому же биологически правдоподобные. В публикации Lacchetti C. et al., 2008 [130], включенной в руководство American Medical Association по использованию медицинской литературы в доказательной медицине, приведены 22 подобных примера.

В принципе, RCT рассматриваются как “золотой стандарт” доказательности [58, 67, 93, 96]. И хотя они имеют множество ограничений [131–133] (и мн. др.), так что в ряде работ прямо отрицается “золотая стандартность” RCT [134–136], все же официальная доктрина присваивает этому чисто экспериментальному подходу наивысший ранг среди методов доказательности причинности для человека (см. пособия за два последних десятилетия [58, 93, 96]). Ниже приведены наиболее известные примеры несовпадения результатов RCT и обсервационных исследований.

4. Фторид калия снижал фрактуры позвоночника в наблюдательном исследовании 1989 г., но не в последующем RCT от 1990 г. (см. в [131]).

5. Данные эпидемиологии и лабораторных работ привели к выводам, что β-каротин снижает риск рака (статья в “Nature” от 1981 г. [137]). Но два RCT 1990-х годов продемонстрировали, что β-каротин увеличивает смертность от рака легкого у курильщиков, хотя это и противоречило всей совокупности эпидемиологических и биологических данных (см. в [51]).

6. Витамин Е в обсервационных исследованиях 1994 г. уменьшал риск ишемической болезни сердца, но RCT от 1994 г. не подтвердило эффект (см. в [131]).

7. Наиболее известным примером несовпадения RCT с наблюдательными эпидемиологическими исследованиями является гормон-замещающая терапия (hormone replacement therapy; HRT) в менопаузе. Этот пример, преимущественно с упором на абсолютность данных RCT (за малым исключением [96]), рассматривается в пособиях и руководствах по эпидемиологии и доказательной медицине [24, 35, 93, 96, 131, 138]. Ранние обсервационные исследования продемонстрировали положительные эффекты эстрогенной терапии, среди которых было снижение частоты коронарных и сердечно-сосудистых патологий, а также общей смертности (шесть работ “случай–контроль”, три кросс-секционных и 15 проспективных исследований; см. в обзоре Stampfer M.J., Colditz G.A., 1991 [139]). Должно было настораживать, однако, что у женщин с HRT была снижена частота смертности также от убийств и самоубийств (Petitti D.V. et al., 1986; 1987 [140, 141]), каковая неправдоподобная зависимость является негативным контролем на наличие конфаундеров (к примеру, образа жизни, привычек и социального положения) [142]. И действительно, первое же RCT от 1998 г. не подтвердило эффекты, равно как и последующие (2002–2012 г.; см. в [138, 143]). Более того, было обнаружено учащение риска коронарных заболеваний, инсультов, тромбозов, легочной эмболии и рака молочной железы [35, 138, 143, 144], так что одно из RCT пришлось остановить досрочно [144]. Все это отразилось в СМИ, причем, порой, в искаженной форме (согласно [143], относительный риск рака молочной железы, равный 1.24, трансформировался в “24-кратное учащение риска рака груди после HRT”). Тем не менее истина лежит между экспериментом и эпидемиологией: было обнаружено, что положительные эффекты HRT превалируют над отрицательными для женщин возрастом 50–60 лет, в то время как при более старшем возрасте значимы, в основном, неблагоприятные последствия (см. в [96, 143]).

Существуют и иные, не менее эффективные факты из других областей.

8. Так, странным выглядит отсутствие связи между психоэмоциональным стрессом (в том числе тяжелым – смертью детей и близких [145]), включая депрессии, и увеличением риска рака различных типов [145–149]. Обнаруженные в отдельных работах ассоциации между психологическим стрессом и злокачественными опухолями молочной железы [145, 150] не отвечают критерию постоянства ассоциации (в обширном датском исследовании не выявлены [151]; см. также в

[145, 147, 150]). А ведь биологическое правдоподобие здесь достигает высокой степени достоверности: доказана и депрессия иммунной системы, и гормональные (нейроэндокринные) сдвиги [93, 146, 152, 153], и связанный с психоэмоциональным стрессом окислительный стресс, который приводит к повреждениям ДНК и к цитогенетическим нарушениям [121, 150, 152–154]. Более того, в опытах на животных неоднократно продемонстрировано, что психоэмоциональный стресс на различных моделях реально увеличивает уровень повреждений ДНК (см. в [121, 150, 154]).

Но эпидемиологические исследования так и не смогли показать названную ассоциацию [145–149]. Хотя и указывается, что стресс может действовать опосредованно, усиливая вредные привычки и неблагоприятный образ жизни, что способно вызывать рак [146, 148]. Теоретически стресс может также промотировать рост и прогрессию опухолей за счет снижения иммунитета и изменения гормонального статуса [148, 152, 155, 156]. Но коррекция стресса у раковых больных не приводила к изменению их выживаемости [148, 157].

Все это перечисленное биологическое правдоподобие [93, 121, 146, 150, 152–154], как видим, не обязательно свидетельствует об эпидемиологически реальных последствиях [145–149]. И на сайте Национального института рака США (National Cancer Institute) ответ на вопрос: “Может ли психологический стресс вызывать рак?” гласит, что свидетельства слабы и противоречивы [148]. На другом официальном сайте, крупнейшей в мире благотворительной компании из Англии, проводящей исследования в области онкологии, которая называется “Изучение рака в Великобритании” (“Cancer Research UK”), тоже указано, что большинство работ не показало увеличения риска рака за счет стресса [149]. Наконец, в документе МАИР (IARC 2014; updated 2018) отмечается (вероятно, со ссылкой на [147]), что мета-анализ данных для 12 европейских когорт не выявил учащения рака (в том числе основных типов) при различных видах стресса на работе [158].

9. Неясен механизм анестезирующего эффекта иглоукалывания. Многие исследователи считают биологически неправдоподобным, что введение в тело иглолок и их вращение там может снимать боль, и, потому, не верят в эффективность акупунктуры [58].

10. Равным образом рассматривается как не имеющий биологического механизма эффект гомеопатии [87] (за исключением слабого и давно преувеличенного [159] эффекта плацебо [87]).

### НЕАБСОЛЮТНОСТЬ КРИТЕРИЯ: “БИОЛОГИЧЕСКИ ПРАВДОПОДОБНЫЙ МЕХАНИЗМ ЛЕГКО НАЙТИ ДЛЯ “ОБЪЯСНЕНИЯ” КАЖДОЙ АССОЦИАЦИИ”

Это – утверждение из редакционной статьи Davey Smith G., 2002 [160], являющееся ответом на некий “стандартный аргумент”, согласно которому гипотезы, основанные на хорошем научном понимании патогенеза, вряд ли могут быть ложными. И здесь уместно провести аналогию с таким же утверждением для критерия “Аналогия”, про который К. Rothman (в том числе с различными соавторами) сказал, что “анalogии обильны” (abound) [74], поскольку “связаны с изобретательским воображением исследователей” [42, 43, 45, 99].

Такие утверждения, на наш взгляд, вряд ли имеют смысл, поскольку входят в противоречие с воспроизводимым во многих эпидемиологических источниках, названным выше тезисом: “доказательства причинности в конечном счете – вопрос суждения” [16, 37, 38, 67].

### КРИТИКА КРИТЕРИЯ: ОТСУТСТВИЕ НАУЧНОЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ, СУБЪЕКТИВИЗМ И ДОГМАТИЗМ, УТВЕРЖДЕНИЕ, ЧТО “КОМБИНАЦИЯ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ДИСЦИПЛИН НЕ МОЖЕТ БЫТЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ДИСЦИПЛИНОЙ”, И ДРУГИЕ ПРЕТЕНЗИИ

Нам известны отдельные авторы, критикующие индуктивный подход к доказательству причинности с помощью “руководящих принципов” или критериев. Собственно во всех сотнях источников разного уровня никакие иные не попадались. Поэтому, скорее всего, таковых авторов больше и нет, во всяком случае из известных.

1. Первой хронологически можно назвать работу от 1979 г. [161] критика широкого профиля, создателя термина “пропатическое смещение” (см. в [3]), одного из “отцов” клинической эпидемиологии [162], Alvan R. Feinstein (1925–2001; США). В предыдущем разделе цитировалась публикация Jacobson R.M., Feinstein A.R., 1992 [129], где рассматривалась “интеллектуальная патология” медиков, по-библейски ослепивших 10000 младенцев своей оксигенацией. Известна нам и публикация А.Р. Feinstein про мета-анализ, где этот подход (но не pooled-анализ) называется “статистической алхимией 21-го века”, поскольку означает “получение чего-то даром, попутно игнорируя установленные научные принципы” [163].

Не прошел А.Р. Feinstein и мимо критериев Хилла [161]. Применительно к “Биологическому правдоподобию” (в форме “Coherent plausibility”) в [161] отмечается, что это “требование” (“de-

mand”) предусматривает биологическую логику. Последняя, однако, основана на парадигматической приемлемости, но не на строгих доказательствах. Автор приходит к выводу об отсутствии научных соображений и стандартов науки<sup>41</sup> при применении критериев причинности; научные принципы, мол, не упоминаются ни среди статистических, ни среди логических компонентов комплекса [161].

По мнению А.Р. Feinstein, необходимо включение неких экспериментальных “стандартов”, подобных тем, что содержат постулаты инфекционных заболеваний Генле–Коха, и тогда появится научность [161]. Но, как можно было видеть в Сообщении 2 [2], постулаты Генле–Коха ничуть не более поддаются стандартизации.

В целом критику А.Р. Feinstein критерия “Биологическое правдоподобие” (и “Coherence”) можно сформулировать так: основанный только на биологической логике, критерий требует принятия исходных парадигм приемлемости, требует суждений, но не строгих доказательств. И потому, мол, критерий по-настоящему не работает. Этот вывод названного автора, однако, устраняет приемлемость на практике доказательных методологий, используемых агентствами окружающей среды [7, 15, 38, 50, 164] и МАИР [57, 165, 166]. А также иных организаций, применяющих подходы, основанные на весе свидетельств (WoE; источники см. выше). И рассматриваемый здесь ранее байесовский анализ (мета-анализ).

2. Вторыми по порядку следует назвать много раз цитируемого нами профессора эпидемиологии Kenneth J. Rothman (род. в 1945 г.) [41, 42, 44, 74, 167] и его частого соавтора, не менее известного исследователя причинности, профессора биostatистики и эпидемиологии Sander Greenland (род. в 1951 г.) [43, 45, 65, 99, 168], оба из США. Подробнее их платформу мы надеемся рассмотреть в Сообщении 4, здесь же упомянем вкратце, что эти авторы полностью отрицают индуктивный подход и, судя по всем признакам, вероятностную причинность, сводя все к конечному многофакторному детерминизму [41–43, 45, 74, 99] (отчасти это уже обсуждалось нами в [2]). Для К.Р. Rothman подобные взгляды обнаруживаются минимум с первого издания его “Modern Epidemiology” от 1986 г. [41] (информация взята из пособия [169]), воспроизводятся затем во втором издании от 1998 г. [42] (“руководящие принципы... обременены оговорками и исключениями”<sup>42</sup>; цитировано по [170]) и в третьем издании от 2008 г. [43] тоже. Мы располагали только последним.

К.Р. Rothman и S. Greenland для каждого критерия, включая необходимость самой ассоциации<sup>43</sup>, находили некое исключение, порой умозрительное. В результате получалось так, что ни

один критерий (кроме “Временной зависимости”, которая признавалась) не является даже слабым “пунктом”, позволяющим иметь какие-то суждения [41–43, 45, 74, 99]. Иными словами, на восемь из девяти положений Хилла K.J. Rothman и S. Greenland всегда предлагали опровержение, похожее иной раз на аргумент персонажа советского кино: “А если бы он вез патроны?” (или, еще хуже, на персонаж В.М. Шукшина, который “срезал”).

Однако авторитет K.J. Rothman и S. Greenland в как бы “теоретической эпидемиологии” достаточно велик (“Нынешняя система эпидемиологии в значительной степени определяется мышлением Ротмана”; пособие от 2016 г. [169]<sup>44</sup>). То есть в такой эпидемиологии, которая отражена не в методических документах организаций, принимающих решения и отвечающих за них, а в учебных пособиях или обзорах. K.J. Rothman часто упоминается в последних как похоронивший причинные критерии. Исходя только из пособий и обзоров, можно, порой, сделать ошибочный вывод, что ныне никаких причинных критериев никто не использует. Подробно вопрос широты применения критериев Хилла и, на наш взгляд, логическую неотъемлемость их от любой доказательности в описательных дисциплинах, запланировано рассмотреть в Сообщении 4.

Что касается “Биологического правдоподобия”, то указанные авторы называют его “важной проблемой”, но данный критерий, по их мнению, и необъективен, и неабсолютен, поскольку часто основан не на логике или данных, а только на предыдущих убеждениях. Попытки путем байесовского подхода количественно оценить по шкале от 0 до 1 вероятность того, что основано на прежних убеждениях, а что — на новых гипотезах, демонстрируют, согласно K.J. Rothman и S. Greenland, догматизм или следование текущей публичной моде. Это приводит к необъективности при оценке гипотезы [45, 99]. Ни байесовский [45, 99] и никакой иной [43] подход не могут превратить правдоподобие в объективный причинный критерий [43, 45, 99]<sup>45</sup>. Использование этого критерия при оценке новой гипотезы может быть только в отрицательном смысле: “для того, чтобы указать на трудность его применения” [45, 99]<sup>46</sup>.

В последней известной нам публикации на тему от K.J. Rothman (2012) про рассматриваемый критерий сказано совсем кратко: “Очень субъективно” [74].

3. Следующей по времени (после первого издания “Modern Epidemiology” под авторством K.J. Rothman в 1986 г. [41]) является публикация профессора теоретической медицины Bruce G. Charlton от 1996 г. [171] (Англия). В 2019 г., исходя из Интернета, B.G. Charlton еще преподавал; судя по PubMed (последняя публикация — от 2012 г.) —

это тоже критик широкого профиля, с довольно необычными работами: “The Zombie science of Evidence-Based Medicine...”, 2009 [172]; “Are you an honest scientist?”, 2009 [173]; “The cancer of bureaucracy: how it will destroy science, medicine...”, 2010 [174] и т.п. Впечатляют, скажем, такие утверждения: “Очевидно, что начало доказательной медицины подобно зомби: она реанимирована из трупа клинической эпидемиологии” [172].

Относительно значимости критериев причинности B.G. Charlton так же, как и названные выше исследователи, стоит на чрезвычайно крайних, отрицающих позициях (подобно брандмейстеру у классиков, который был настолько правым, что даже не знал, к какой партии принадлежит).

Рассуждая о мультидисциплинарном и междисциплинарном подходах в эпидемиологии, B.G. Charlton отмечает их мозаичность. Каждый элемент мозаики, состоящий из конкретных данных, может быть оценен на научную валидность, но метод, которым эти элементы связаны-склеены, не является научным, потому что, согласно [175, 176], комбинация доказательств от разных дисциплин не может быть самостоятельной научной дисциплиной. Если пробелы в доказательствах для одной дисциплины заменяются или обходятся с помощью данных из другой дисциплины и наоборот [177], то получается, что совмещается малосовместимое. Действительно, поскольку интегрируются данные, полученные путем ряда “несоизмеримых” (или качественно различных) подходов, методологий и способов доказательности, то эпидемиология должна положиться на суждение (judgment), на “здравый смысл”, в большей степени, чем другие науки [171].

B.G. Charlton сравнивает доказательные свидетельства в эпидемиологии с “сетью” связанных данных из множества дисциплин. Недостаточность или некорректность в какой-то ячейке не “рвет”, не устраняет всю сеть, а только ослабляет ее, ибо это *сеть*. То есть эпидемиологические гипотезы весьма слабо фальсифицируемы (согласно положениям К. Поппера [1, 37]): противоречивые результаты могут только изменить равновесную вероятность мультифакториальной причинной обусловленности. Это объясняет длительную жизнь и устойчивость иных эпидемиологических гипотез даже перед лицом противоречащих фактов (от себя скажем: см. выше примеры в предыдущем разделе). Напротив, “настоящие” научные гипотезы построены на *цепочке* свидетельств и отдельных доказательных звеньях, а потому устранение любого звена как некорректного сразу же полностью устраняет и саму гипотезу [171].

Среди цитированных B.G. Charlton источников на тему ненаучности интегрирования дисциплин публикация [175] представляет собой монографию 1987 г. под названием “Молекулы и ум”

(“Molecules and Mind”), а работа [176] от 1990 г. принадлежит самому V.G. Charlton, и она посвящена критике “биологической психиатрии”.

В целом рассуждения названного автора не лишены смысла, когда речь идет не об эпидемиологии, а например, о психологии или, скажем, о непроверяемых на практике ретроспективных дисциплинах. А также — когда критикуются претензии на *количественные* связки между фрагментами эпидемиологических доказательств, как это декларируется для телеанализа (см. выше). Но в случае подхода преимущественно в качественном смысле, предусматривающего, как сказано, “вес свидетельств”, столь абсолютистские рассуждения делают бессмысленными многие практические шаги международных организаций, направленные на сохранение здоровья и окружающей среды.

Рассмотренная достаточно старая публикация Charlton V.G., 1996 [171] цитируется рядом авторов, занимающихся философией эпидемиологической причинности. Представляется целесообразным (почему — далее) привести сводку таких источников с указанием смысла цитирования:

- Weed D.L., 1997 [59]. Информация про авторитета D.L. Weed нами неоднократно приводилась ранее [2, 3] (см. также прим. 2). “Charlton, с другой стороны, утверждал, что использование причинно-следственных критериев снижает обоснованность причинно-следственных выводов”<sup>47</sup> (на самом деле в оригинале [171] утверждения не столь однозначны; см. исходную цитату в [2]).

- Parascandola M., Weed D.L., 2001 [178]. Первый автор тоже весьма авторитетен своими публикациями на тему. “Charlton также утверждает, что фундаментальные науки строятся на концепции необходимых причин, и что эпидемиология, чтобы быть научной, должна следовать этой модели”<sup>48</sup>.

- Arnett J.C., 2006 [179]. Автор из Competitive Enterprise Institute (CEI); обсуждение подходов USEPA. “OMB [The Office of Management and Budget] просто агрегирует или компилирует оценки различных агентств; но никогда ни обзор, ни переадресация (endorsed) всех используемых “различных методологий”, не дает ценных и успешных оценок (Charlton V.G., 1996)”<sup>49</sup>.

- Bluming A.Z., 2009 [180]. Презентация из университета в Калифорнии на симпозиуме по HRT, а также сопутствующая публикация в журнале. Воспроизведен фрагмент из Charlton V.G., 1996 [171] про “настоящую” гипотезу из цепочки причин и про эпидемиологическую гипотезу, представляющую собой “сеть” из связанных данных множества дисциплин (см. выше)<sup>50</sup>.

- Morabia A., 2013 [181]. Вновь весьма упоминаемый автор; см. в [1, 2]. Цитирована работа

Charlton V.G., 1996 [171] в свете обсуждения критериев после 1965 г.

- Пособие из США по статистике и причинности от 2016 г. [169]. “...пока Rothman (1986) не только не раскритиковал все предположения [о критериях] как неубедительные (см. также Charlton, 1996)”<sup>51</sup>.

- Peeters P.J.H.L., 2016 [182]. Объемный (246 с.) отчет исследования по европейским программам. Всего 13 цитирований работы Charlton V.G., 1996 [171], большинство по теме и без обсуждения. К примеру: “Способ, которым взвешиваются эпидемиологические свидетельства, подвергся критике. По словам Charlton (1996, p.106)...”<sup>52</sup>.

Мы располагали еще семью источниками (1997–2011), где упоминаются/приводятся положения из [171], но эти работы или более старые, или выглядят менее весомыми.

Таким образом, имеются 14 источников (половина из них точно весомые), в которых без какой-либо критики рассматриваются резко отрицающие положения V.G. Charlton от 1996 г. [171]. Получается опять, что при необходимой конъюнктуре желающий может с помощью авторитетных источников (добавив еще публикации K.J. Rothman и S. Greenland) не только опровергнуть критерий “Биологическое правдоподобие”, но и большинство “логических” критериев Хилла. И может поставить под сомнение адекватность подходов и выводов USEPA, МАИР и т.п. Или других исследований, синтезирующих данные из разных дисциплин, либо находящихся на их стыке.

4. Последними из известных нам критиков следует назвать профессоров Karen J. Goodman и Carl V. Phillips из Канады, которые являются частыми авторами статей о причинности в различного рода энциклопедиях и пособиях [30, 183]. C.V. Phillips при этом имеет связи с табачными компаниями [184, 185].

В статье от 2005 г. этих исследователей сказано, что за исключением “Временной зависимости” ни один из критериев не является ни необходимым, ни достаточным. И не ясно, как количественно оценить степень важности каждого критерия, не говоря уже о том, чтобы обобщить такой подход в суждение о причинности [183]. Относительно критерия “Биологическое правдоподобие” можно отметить, что K.J. Goodman (с иным соавтором) рассматривает его совместно с “Coherence” и “Analogy” [30].

Важным утверждением является следующее: “По-видимому, нет эмпирических оценок на сегодняшний день действительности или полезности причинно-следственных критериев (например, ретроспективных исследований того, как использование критериев улучшает выводы анализа). Коротко говоря, значение комплекса критериев для при-

чинного вывода строго ограничено и не было проверено” [183]<sup>53</sup>.

Сходные положения можно найти и у других авторов. К примеру, в Gori G.V., 2004 [186]: “Лишенные и количественных, и качественных точек отчета, эти критерии остались субъективными и не связанными с независимой экспериментальной проверкой”<sup>54</sup>.

Это, так сказать, квинтэссенция всей критики комплекса критериев: декларируется, что успешность их применения *никогда не была проверена на практике* путем сравнения с другими подходами. Но статьи [183, 186] были опубликованы в 2005 г. и в 2004 г. соответственно, а в 2009 г. нидерландские авторы предложили методологию взвешивания критериев и проверили валидность использования этой методики для известных канцерогенов, причем успешно (Swaen G., van Amelsvoort L., 2009 [67]). Данные подобного рода, по градации и взвешиванию критериев, а также иные подходы к установлению каузации [187], планируется рассмотреть в Сообщении 4. Отметим только, что и K.J. Rothman, S. Greenland [42, 43, 99], и K.J. Goodman, C.V. Phillips [188, 189] попытались такие подходы предложить (по нашему субъективному мнению – только в теории).

Подведя итог разделу, сформулируем единственное бесспорное утверждение: критерий “Биологическое правдоподобие” не абсолютен. Ни необходим, несмотря на всю его значимость, ни достаточен [11, 13, 27, 29, 38, 49, 58, 64], несмотря на его роль в комплексе правил причинности для агентств по охране окружающей среды и токсикологии [16]. И все же без него любое доказательство выглядит неполным, и ущербным. Всегда на ум будет приходиться нечто вроде связи между потреблением мороженого и смертностью от утопления [1], между линейным размером пениса и обратной величиной ВВП в стране [80].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном разделе основной массив ссылок не приводится; их можно найти выше.

В отсутствие прямого эксперимента биологическое правдоподобие было важной составляющей гипотез о причинности в медико-биологических дисциплинах по крайней мере с 19-го века. В период становления руководящих принципов/критериев оценки вероятности каузальной связи между воздействием и эффектом (1950–1960-е годы) пункт “Biological plausibility” был предложен одним из первых (A.M. Lilienfeld; 1957 г.). Далее это положение иной раз заменялось на похожий по смыслу критерий “Coherence” (согласованность с известными фактами природной истории и биологии заболевания; 1964 г.), но A.V. Hill в 1965 г. ввел в свой список оба пункта.

С тех пор руководящий принцип “Биологическое правдоподобие” приобретал все большую значимость, особенно в таких дисциплинах (экология, токсикология, исследование канцерогенных факторов), в которых есть трудности не только в постановке адекватных экспериментов, но даже в самом наблюдении эффекта. В подобных случаях для оценки вероятных эффектов воздействия для последующего принятия решений в области здравоохранения приходится полагаться в том числе на молекулярную эпидемиологию (“суррогатные EndPoints” – биомаркеры), эксперименты на животных и *in vitro*. Такая ситуация наблюдается в том числе в судах США при вынесении заключения о компенсациях за то или иное воздействие (“правило Дауберта”).

Критерий “Биологическое правдоподобие” остается важным и в классической эпидемиологии; следование ему весьма желательно, а порой и необходимо, даже когда связи статистически выявлены. Одни только эпидемиологические подходы не способны доказать истинную причинность связи (возможно влияние случайностей, конфаундеров, смещений и обратной причинности). Статистические подходы направлены лишь на доказательство реальности и постоянства ассоциаций. Без знания биологического механизма, правдоподобной модели такие связи (в особенности слабые) не могут расцениваться как подтверждение выдвинутой гипотезы об истинной причинности эффекта от воздействия.

Суть названного критерия сводится к интеграции данных из различных дисциплин медицинского и биологического профиля. Этот подход при установлении причинности настолько важен, что в целом ряде источников, в профильных публикациях и пособиях по эпидемиологии, авторы специально подчеркивают его необходимость. В представленном обзоре приведены соответствующие цитаты, в том числе для радиобиологии и радиационной эпидемиологии. Выходит так, что данные из почти любой сферы медико-биологических и молекулярно-клеточных дисциплин могут внести важный вклад в поиск доказательств для эпидемиологических изысканий. Это придает практическую значимость почти любым экспериментальным исследованиям, какими бы фундаментальными и теоретическими они ни казались.

Некоторые ведущие авторы детализировали уровни достижения биологического правдоподобия. В работе Weed D.L., Hursting S.D, 1998 [29] предложены три уровня, от первого, когда есть предположение о механизме, но нет биологических подтверждений, через второй, когда подтверждения предоставляются молекулярной биологией и молекулярной эпидемиологией, до третьего, наивысшего уровня, когда появляются

данные о влиянии конкретно изучаемого фактора на механизм. Равным образом, M. Susser в 1977 и 1986 г. [25, 36, 37] сформулировал четыре уровня для аналогичного по смыслу критерия “Coherence”. Достижение его значимости включает следующие элементы согласованности: 1) с теоретическим правдоподобием, 2) с биологическими знаниями (т.е. “Биологическое правдоподобие”), 3) с фактами и 4) со статистическими закономерностями, включающими зависимость “доза—эффект”.

В конечном счете, все это вопрос суждения: достаточно ли собрано свидетельств, чтобы исключить альтернативные объяснения (“Вес свидетельств”). К тому же решение о причинной обусловленности во многом опирается на интуицию исследователей [33, 163], о чем писал еще A.V. Hill в 1965 г. [11]. Последнее утверждение в полной мере относится и к достижению приемлемого уровня биологического правдоподобия. Упомянутые выше C.V. Phillips и K.J. Goodman в 2004 г. [190] отмечали, однако, что правильный подход к интуитивной оценке ныне почти полностью утрачен. Так, исследования 1970-х и 1980-х годов продемонстрировали, что как обычные люди, так и эксперты имеют плохую количественную интуицию, и потому никакая интуиция не может устранить необходимость в современных методах количественной оценки неопределенности [190].

Одной из известных методологий интегрирования данных различных дисциплин является “Байесовский анализ” (“Байесовский мета-анализ”). Он опирается на вес свидетельств (доказательств), а не на одно конкретное исследование, следуя тем же принципам, что и принятие решений по Байесу. Метод предусматривает интеграцию всех доступных медико-биологических данных в одну обновляемую и стандартизованную оценку, которая определяет общую силу причинной обусловленности.

Безотносительно важности и необходимости критерия “Биологическое правдоподобие”, он, как и почти все критерии Хилла (восемь из девяти, кроме “Временной зависимости”) не является ни необходимым, ни достаточным для доказательности. Имеется ряд примеров (в том числе по воздействию радиации), приведенных в настоящей публикации, которые показывают, во-первых, что “правдоподобие” зависит от текущих биологических знаний, и, во-вторых, что имеются реальные, но кажущиеся неправдоподобными ассоциации, равно как и наоборот.

Отсюда вытекает критика некоторыми авторами как конкретно критерия “Биологическое правдоподобие”, так и всего индуктивного подхода, опирающегося на причинные критерии. Указывается на недостаточную научность и точность подхода (A.R. Feinstein), на субъекти-

визм, догматизм и неабсолютность критериев (K.J. Rothman и S. Greenland), на некорректность методов, интегрирующих данные из различных дисциплин, не одинаковых ни по подходу, ни по методологиям, ни по доказательности (B.G. Charlton), а также на то, что критерии причинности никогда не были проверены на практике (K. Goodman и C.V. Phillips). Последнее утверждение было высказано в 2005 г., однако с этого времени ситуация изменилась: в 2009 г. критерии Хилла были модифицированы путем определения весомости каждого, а методология проверена на стандартных канцерогенных агентах (G. Swaen G. и L. van Amelsvoort [67]).

Несмотря на высказанную критику и сомнения, несмотря на то, что критерий “Биологическое правдоподобие”, как сказано, не абсолютен, тем не менее, без него любое эпидемиологическое свидетельство выглядит и неполным, и ущербным. Как отмечается в [191], нельзя пренебрегать тем фактом, что эпидемиология является биологической наукой, связанной с болезнями людей, причем основой являются клинические дисциплины.

Настоящая публикация, вместе с предыдущими специальными обзорами по критериям “Сила связи” [4, 5] и “Временная зависимость” [3], представляют собой детализированную преамбулу к запланированным сообщениям 3 и 4 нашего цикла, посвященным сути, ограничениям, широте применения и радиационному аспекту руководящих принципов/критериев причинности.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВОЗМОЖНОСТЬ СУБЪЕКТИВНЫХ УКЛОНОВ

Конфликт интересов отсутствует. Настоящее исследование, выполненное попутно в рамках более широкой бюджетной темы НИР ФМБА России, не поддерживалось никакими иными источниками финансирования. При выполнении работы не имелось временных рамок, официальных требований, ограничений, или же иных внешних объективных либо субъективных вмешивающихся факторов.

## ПРИМЕЧАНИЯ

1. Материал по проблеме причинности и методологиям ее установления (критерии и многое другое) было бы полезно оформить в виде монографии, подобно первому изданию такого рода Susser M., 1973 [6] и, к примеру, сборнику 2015 г. на 497 страницах по причинности в экоэпидемиологии под редакцией ведущих авторов из U.S. Environmental Protection Agency (USEPA; S.B. Norton, S.M. Cormier, G.W. Suter II) [7]. Монография на эту тему на русском языке может

быть актуальна в связи со слабыми соответствующими понятиями в российских естественно-научных, медицинских и эпидемиологических сферах, равно как и в обыденно-научной и в обыденной российской жизни (см. в [1–5]). Но стимулы к созданию такой монографии отсутствуют.

2. Ныне функционирующий Douglas L. Weed (США) за десятки лет уделил много внимания теории и практике каузации (масса публикаций и синтетических исследований), будучи консультирующим экспертом по проблемам на стыке медико-биологических дисциплин, права, коммерции и государственной политики (см. также в [2]). В наших работах по причинности [1–4] публикации D.L. Weed цитируются, вероятно, чаще, чем других авторов.

3. “The agent should be shown to be carcinogenic to some animal species (not obligatory)” [18]. (Здесь и далее перевод цитат наш. – *Авт.*)

4. “...biologic plausibility of the association, which is dependent upon our general knowledge of the biology of these specific diseases” [21]. Смысловое сочетание “biologically implausible” (биологическое неправдоподобие) имело место намного ранее, к примеру, в постановлении органа английского здравоохранения от 1854 г., согласно которому эпидемиологические доказательства заражения холерой через лондонскую воду (исследователь John Snow) не поддержаны значимыми лабораторными свидетельствами (цитировано по Sartwell P.E., 1960 [22]).

5. Имевшее широкое международное значение Сообщение Surgeon General (Главного врача [24]) США о последствиях курения от 1964 г. [23] является первой ключевой вехой в официальном оформлении методов доказательства причинности хронических патологий, в том числе рака. Расценивается как официальная дата окончательного установления связи между курением и раком легкого (подробнее см. в [2]).

6. В упоминавшейся монографии Susser M., 1973 [6], которая недоступна, пункт “биологическая теория и эксперимент”, согласно источнику [26], тоже был рассмотрен, причем назван “окончательным критерием для причинной связи”.

7. Приведены все уместные ссылки из использованных в настоящем обзоре.

8. “Epidemiology, molecular pathology (including chemistry, biochemistry, molecular biology, molecular virology, molecular genetics, epigenetics, genomics, proteomics, and other molecular-based approaches), and animal and tissue culture experiments should all be seen as important integrating evidence in the determination of human carcinogenicity” (National Cancer Institute USA; workshop 2003) [53].

9. Особенно впечатляет обзор Ward A.C., 2009 [61], где 19 страниц теста PDF (до списка литера-

туры) имеют рубрики “Abstract”, “Introduction”, “Analysis” и “Conclusion”.

10. “Despite these uncertainties, experience has shown that animal evidence can be relevant, and where it exists it should be taken into account” [62].

11. “The causal relationship was considered biologically plausible when evidence for a probable cause-effect mechanism was found in the scientific literature” [66].

12. Положением из [54, 57, 68], согласно которому для вывода о причинности, помимо самого факта ассоциации и временной зависимости, достаточно еще только “Биологического правдоподобия” в форме механизма, показанного экспериментально, можно воспользоваться при необходимой конъюнктуре (ссылки весомые). Хотя, конечно, только с оглядкой, поскольку, как будет видно ниже, имеется достаточно исключений и само понятие “механизм” ограничено рамками достигнутого уровня знаний.

13. В статье [72] разбирается вопрос о том, какие эпидемиологические данные будут публиковать редакция. Вряд ли увидит свет информация об эффекте, который и слаб, и биологически неправдоподобен. Хотя может быть опубликовано сообщение о небольшом эффекте, имеющем биологический смысл, или же о большом эффекте, который его не имеет.

14. “Advances in the biologic sciences and their integration with public health science in molecular epidemiology [ref.] make one causal criterion, biologic plausibility (sometimes called biologic coherence), an increasingly important consideration in causal inference” [29].

15. “...biological plausibility represented fundamental concepts of data integration – the criterion implies that epidemiology and biology must interact” [34] (со ссылкой на [52]).

16. “All of the relationships and findings should make biologic and epidemiologic sense” [75].

17. “The cause–effect relationship should make biological sense” [33].

18. “Biologic plausibility is where biology and epidemiology merge” [46].

19. “Demonstrating biological plausibility is not part of epidemiological methods. This does not, however, mean epidemiologists can forget about it. Epidemiologists need to understand the biology of the diseases they study, explain their hypotheses in biological terms, and propose and promote (sometimes even lead) biological research to test hypotheses” [33].

20. “Ultimately, biological processes govern all diseases and adverse health outcomes, without exception. This applies to social and physiological processes alike – so the ill effects of economic deprivation on health must, ultimately, occur through biology” [33].

21. “Data integration refers to the incorporation of data, knowledge, or reasoning from across multiple disciplines or approaches, with the goal of generating a level of understanding or knowledge that no discipline achieved alone” [34].

22. “Today, researchers considering causal inference must integrate data from a variety of scientific disciplines” [34].

23. “Medical progress is often best advanced when the sciences that focus on subcellular and molecular basic research work in tandem with the population-oriented science of epidemiology” [31].

24. “...on a wide variety of evidence of differing scientific value, including epidemiology, animal studies, chemical analogies, case reports, regulatory findings, and other secondary sources” [32].

25. “...experts in radiation protection, both legislators and practitioners, maintain an understanding of the current state of knowledge in the radiobiology and epidemiology that underpins their subject in order to ensure that the decisions made about regulation are appropriate” [76].

26. “As epidemiology reaches its limits it turns to radiobiology for help!” [77].

27. “Integrating basic radiobiological science and epidemiological studies: why and how”. “A greater role can be established for the use of basic radiobiology data in the development of radiation risk estimates” [79].

28. Работа [80] – не пародия и не датирована 1 апреля (дата выхода – июль). Публикация, хотя и названная “дискуссионной”, находится в качестве рядовой в базе на сайте Хельсинкского Центра экономических исследований (Helsinki Center of Economic Research). Исследование выполнено вполне серьезно: в начале статьи автор приносит благодарности ряду таких же, по-видимому, изыскателей за “проницательные комментарии” и за предоставление сведений о размерах пениса, а в приложениях находятся все исходные данные. Но дела с ВВП для выборки из 76 стран были связаны вовсе не с размерами указанного органа, а с расовой физиологией, которая оказалась вмешивающимся фактором (конфаундером). А именно: на графике зависимости ВВП от длины пениса из [80] “сверху и слева” представлены развитые страны Азии (Южная Корея, Япония, Сингапур и др.), а “справа и внизу” – неразвитые страны Африки (Чад, Судан и т.п.). Остальные страны в большинстве распределены посередине. Отсюда и выявилась “высокая обратная корреляция” ( $r = -0.447$ ). Этот момент в [80] почему-то не обсуждается, зато имеется гипотеза о влиянии тестостерона, уровень которого, согласно Т. Westling, отражается на склонности населения к рискам, в том числе экономическим. Вероятно, имеется в виду, что в Африке сильно склонный к рискам народ пускает свою экономику на разные сомни-

тельные “пирамиды”. В “Заключении” статьи [80] автор отмечает: “Несколько удивительно, что длина пениса являлась более строгой детерминантой экономического развития, чем политический режим страны” (“Somewhat surprisingly, penile length was a stronger determinant of economic development than country’s political regime type”). Если это розыгрыш, то уж очень глубоко запятанный. И надо добавить, что по критериям Хилла работа [80] ни за что бы не прошла.

29. “Confidence Profile Method” – простой перевод означает “Метод профиля достоверности”. Единственный обнаруженный русскоязычный источник, где приведено указанное англоязычное название, – это статья в белорусском журнале от 2005 г. [83], где перевода нет. Хотя метод “байесовского сетевого мета-анализа” в российских медицинских исследованиях используется нередко (см., к примеру, по поиску в Google).

30. “There are historical instances in which a statistical association did not originally conform to existing biological concepts. As advances in knowledge changed the biological concepts, these new concepts were found to be consistent with the previously observed association. Conversely, there have been instances in which the statistical association was interpreted as being consistent with existing biological concepts, but later the interpretation of the association was found to have been erroneous” [20].

31. “It is needless to point out that our interpretation of any relationship is limited by our biologic knowledge, and it may well be that an association which at preset does not appear to be biologically plausible will turn out to be so when our knowledge has been extended. [4]. In fact, the finding of a biologically implausible association may be the first lead to this extension of knowledge. However, all that can be done is to indicate that the association should be investigated further” [21] со ссылкой на [20].

32. “The Biologic Reasonableness of the Association – This point cannot and should not be left out of consideration, but we must be wary of it, for judgments made on this basis are hemmed in by the imperfect knowledge existing at any time” [22].

33. Потребив за три года вместе с сожительницей порядка 1400 бутылок “Radithor” (~2.8 мКи), Е.М. Vuers потерял челюсти, частично череп и умер страшной смертью. Через полгода умерла от того же и его подруга. Ныне останки жертвы доверия к “текущему научному знанию” покоятся на кладбище в Питтсбурге, в свинцовом гробу (период полураспада  $^{226}\text{Ra}$  1600 лет) [106, 107]. Хотя “текущее научное знание” (“биологическое правдоподобие”) и тогда свидетельствовало несколько об ином. О том, что воздействие  $^{226}\text{Ra}$  может оказывать деструктивные эффекты на клетки крови [109] и грызунов [110], показано еще в 1920-х годах. Так, в работе Sugiura K., Failla G.,

1922 [110] было продемонстрировано, что если относительно малая экспозиция  $^{226}\text{Ra}$  (2.4 мКи/ч) стимулировала рост мышей (с попутной перманентной стерилизацией самок, что, ясно, нежелательно), то воздействие при 21.9 мКи/ч обладало обратным эффектом, а при 36.5 мКи/ч отмечалась скорая гибель животных. Еще раньше, в 1913 г., W.C. Lazarus-Barlow обнаружил, что окончательным депо для  $^{226}\text{Ra}$  является костная ткань [111] (цитировано по [107]). Затем этот же автор в 1924 г. предположил роль  $^{226}\text{Ra}$  как причины рака [112]. Словом, научных оснований не пить радиевую воду, да еще в подобных количествах, хватало и до середины 1920-х годов. Однако “Radithor” был назначен E.M. Myers в 1927 г. врачом, когда гольфист сломал себе руку, упав в поезде. “Для помощи заживлению” [107]. Эликсир из дистиллированной воды и  $^{226}\text{Ra} + ^{228}\text{Ra}$  так понравился E.M. Myers и так его “бодрил” по ощущениям, что он добрал свою дозу уже без доктора [106, 107]. Предполагают стимуляцию потенции, поскольку данная личность была известна своими похождениями [106, 113]. “Radithor” принимали в то время многие важные фигуры [106], но, вероятно, не в таких количествах, и потому другие сведения о последствиях нам не известны.

34. “Популярные в начале 20-го века суппозитории “Vita Radium” содержали настоящий радий, излучение которого, как говорили, заряжало организм, подобно “зарядке электрической батареи”. Суппозитории, как утверждалось, лечили усталость, импотенцию, сниженное либидо и геморрой” (“Vita Radium Suppositories Popular during the early 20th century, Vita Radium suppositories contained real radium, the radiation of which was said to charge up the body like “charging up an electric battery”. The suppositories were claimed to cure fatigue, impotence, low sex drive, and hemorrhoids”) [114].

35. “...shows you actual Atomic disintegration of radioactive materials!” [117].

36. Пока нет данных, что эти тонкие изменения могут реализоваться в ощутимые нарушения, аномалии и патологии, которые зарегистрировать так и не удалось на десятках тысяч потомков в различных когортах в течение более чем 60 лет [8, 118–122].

37. Авторы [125, 126] указывают, что, поскольку возраст потомков не превышал 40 лет, а эпигенетические изменения зависели от возраста, существует возможность, что частота передавшихся трансгенерационно изменений может повыситься (accelerated) в будущем.

38. Основы так называемого “правила Дауберта” (“Daubert ruling”, “Daubert standard”) заложены по прецеденту 1993 г., когда родители детей, рожденных с серьезными дефектами, J. Daubert и E. Schuller, подали в суд иск на фармакологическую компанию, утверждая, что к дефектам при-

вело употребление беременными препарата Bendectin [4, 31, 32]. Суд рассмотрел все уместные данные из медико-биологических дисциплин.

39. “The courtroom is not the place for scientific guesswork, even of the inspired sort. Law lags science; it does not lead it.” [32].

40. Здесь уместно добавить, что, как указано в пособии Rothman K.J. et al., 2008 [43], при определении риска смертности от некоего интервенционистского фактора следует оценить весь спектр возможных причин (контрафактических [1]). В [43] приведен пример с оральными контрацептивами, которые, в принципе, способны увеличить риск смерти в течение 10 лет (к примеру, от инфаркта миокарда или инсульта). Но сразу же следует рассмотреть альтернативу приема контрацептивов, которой может оказаться беременность. А беременность и роды также имеют свой риск смерти, и он может быть выше, чем от контрацептивов. В связи с этим последние на практике окажутся превентивным фактором смертности, т.е. не причинным. И только если альтернативой будет другой контрацептив, без побочных эффектов (но не роды), то первые противозачаточные препараты, с недостатками, могут оцениваться как причина смерти. Равным образом то, что отмена оксигенации недоношенных детей, устранив риск ослепления, попутно привела к увеличению смертности от респираторного дистресс-синдрома [129], наводит на мысль, что и в этом случае риски должны сравниваться и взвешиваться до вынесения каких-то суждений.

41. Требований к типам и качеству исследований, которые будут использоваться, к их дизайну, строгому набору методов устранения случайностей, смещений и конфаундеров, к качеству базовых данных [161]. То есть некие самые общие требования.

42. “The Hill guidelines... are saddled with reservations and exceptions (Rothman 1998, p. 27)” [42]; цитировано по [170]).

43. Уже рассматривалось в [1, 3], но вследствие неординарности мышления предложивших такое исключение, целесообразно напомнить и здесь. В работе Greenland S., Robins J.M., 1986 [168] приведен, по цитате из [60], “бивариантный контрафактический” пример. Сделано допущение, что половина индивидуумов в популяции чувствительна к некоему воздействию и может умереть от него, а другая половина может умереть именно из-за отсутствия такого воздействия (от себя представим популяцию, где, скажем, половина — тяжелые наркоманы, необходимая доза зелья для которых смертельна для обычного человека). Если экспозиция распределится по популяции случайным образом, то ожидаемый средний причинный эффект будет равен нулю: не обнаружится никакой ассоциации между воздействием и

смертностью в бесконечно большой группе. Но наблюдаемый результат для каждого индивидуума окажется причинно обусловлен фактом подвергания или неподвергания воздействию [60, 168]. Таким образом, для каузальной связи даже ассоциация не обязательна. Остается дождаться такой пелевинско-оруэлловской модели, которая покажет, что для установления причинности не нужна и сама причинность. Но это, скорее, из области незаконного правосудия.

44. “While the Hill criteria give some useful heuristics for determination of causality, the current system of epidemiology is very much determined by the thinking of Rothman” [169].

45. “Plausibility refers to the biological plausibility of the hypothesis, an important concern but one that is far from objective or absolute... Such is the problem with plausibility: it is too often not based on logic or data, but only on prior beliefs”. “The Bayesian approach to inference attempts to deal with this problem by requiring that one quantify, on a probability (0 to 1) scale, the certainty that one has in prior beliefs, as well as in new hypotheses. This quantification displays the dogmatism or openmindedness of the analyst in a public fashion, with certainty values near 1 or 0 betraying a strong commitment of the analyst for or against a hypothesis. It can also provide a means of testing those quantified beliefs against new evidence. Nevertheless, the Bayesian approach cannot transform plausibility into an objective causal criterion’ [99]. ‘Nevertheless, no approach can transform plausibility into an objective causal criterion” [43].

46. “This is not to say that biological knowledge should be discounted when evaluating a new hypothesis, but only to point out the difficulty in applying that knowledge” [99].

47. ‘Charlton, on the other hand, argued that using causal criteria diminishes the validity of causal inferences’ [59].

48. “Charlton similarly claims that the basic sciences are built on the concept of necessary causes and that epidemiology, in order to be scientific, should follow that model” [178].

49. OMB [The Office of Management and Budget] simply aggregated or compiled various agency estimates; it neither reviewed nor endorsed all the “varied methodologies” agencies use to derive cost and benefit estimates (Charlton B.G., 1997) [179].

50. “Disproving even a single item of evidence can, in principle at least, overthrow a whole scientific hypothesis, because a causal chain is only as strong as its weakest link. By contrast, epidemiological hypotheses are supported by a network of linked evidence from numerous disciplines, and cutting any single strand may weaken a net, but does not break it. Contradictory findings cannot do more than alter the balance of probability of multifactorial epidemiological causation. This explains the long life, resilience, and apparent irrefut-

ability of such epidemiological hypotheses in the face of powerful items of apparently contradictory evidence” [180].

51. “...until Rothman (1986) not only criticized all of the assumptions as nonconclusive (see also Charlton, 1996)” [169].

52. “This manner in which epidemiologic evidence is weighted has led to the criticism that, in the words of Charlton (1996, p. 106)...” [182].

53. “Furthermore, there appear to be no empirical assessments to date of the validity or usefulness of causal criteria (e.g., retrospective studies of whether appealing to criteria improves the conclusions of an analysis). In short, the value of checklists of criteria for causal inference is severely limited and has not been tested” [183].

54. “Bereft of quantitative and qualitative benchmarks, these criteria have remained judgmental and are not linked to independent experimental verification” [186].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Котеров А.Н.* Критерии причинности в медико-биологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение 1. Постановка проблемы, понятие о причинах и причинности, ложные ассоциации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 1. С. 1–32. [*Kotero A.N.* Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Report 1. Problem statement, conception of causes and causation, false associations // Radiation biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 1. P. 1–32. (In Russian. Engl. abstr.)] <https://doi.org/10.1134/S0869803119010065>
2. *Котеров А.Н.* Критерии причинности в медико-биологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение 2. Постулаты Генле–Коха и критерии причинности неинфекционных патологий до Хилла // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 4. С. 341–375. [*Kotero A.N.* Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Report 2. Henle–Koch postulates and criteria for causality of non-communicable pathologies before Hill // Radiation biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 4. P. 341–375. (In Russian. Engl. abstr.)] <https://doi.org/10.1134/S0869803119040052>
3. *Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Бирюков А.П.* Критерий Хилла “Временная зависимость”. Обратная причинность и ее радиационный аспект // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 2. С. 115–152. [*Kotero A.N., Ushenkova L.N., Biryukov A.P.* Hill’s criteria “Temporality”. Reverse causation and its radiation aspect // Radiation biology. Radioecology. 2020. V. 60. №2. P. 115–152. (In Russian. Engl. abstr.)]
4. *Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С. и др.* Сила связи. Сообщение 1. Градации относительного риска // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 5–17. [*Kotero A.N., Ushenkova L.N., Zubenkova E.S. et al.* Strength of association.

- Report 1. Graduation of relative risk // *Medical Radiology and Radiation Safety*, Moscow). 2019. V. 64. № 4. P. 5–17. (In Russian. Engl. abstr.)  
[https://doi.org/10.12737/article\\_5d1adb25725023.14868717](https://doi.org/10.12737/article_5d1adb25725023.14868717)
5. *Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С. и др.* Сила связи. Сообщение 2. Градации величины корреляции // *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2019. Т. 64. № 6. С. 12–24. [Koterov A.N., Ushenkova L.N., Zubenkova E.S. et al. Strength of association. Report 2. Graduation of correlation size // *Medical Radiology and Radiation Safety*, Moscow). 2019. V. 64. № 6. P. 12–24. (In Russian. Engl. abstr.)]  
<https://doi.org/10.12737/1024-6177-2019-64-6-12-24>
  6. *Susser M.* Causal Thinking in the Health Sciences: Concepts and Strategies of Epidemiology. New York: Oxford Univ. Press, 1973. 181 p.
  7. *Ecological Causal Assessment* / Eds S.B. Norton, S.M. Cormier, W. Glenn. Suter II. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH, USA: CRC Press, 2015. 497 p.
  8. BEIR VII Report 2006. Phase 2. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. National Research Council. <http://www.nap.edu/catalog/11340.html> (address data 04.07.2019)
  9. *Doll R.* Weak associations in epidemiology: importance, detection, and interpretation // *J. Epidemiol.* 1996. V. 6. № 4. Suppl. P. S11–S20.  
[https://doi.org/10.2188/jea.6.4sup\\_11](https://doi.org/10.2188/jea.6.4sup_11)
  10. *Causality in the Sciences* / Eds P.M. Illari, F. Russo, J. Williamson. New York: Oxford University Press, 2011. 882 p.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199574131.001.0001>
  11. *Hill B.A.* The environment and disease: association or causation? // *Proc. R. Soc. Med.* 1965. V. 58. № 5. P. 295–300.  
<https://doi.org/10.1177/0141076814562718>
  12. *Evans A.S.* Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited // *Yale J. Biol. Med.* 1976. V. 49. № 2. P. 175–195.
  13. *Glynn J.R.* A question of attribution // *Lancet*. 1993. V. 342. № 8870. P. 530–532.  
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91651-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91651-2)
  14. *A Dictionary of Epidemiology* / Ed. J.M. Last. Oxford: Oxford University Press, 2001. [Эпидемиологический словарь под редакцией Дж.М. Ласта для Международной эпидемиологической ассоциации: Пер. с англ. под ред. В.В. Власова (отв. ред.) и др. М.: Открытый институт здоровья в рамках проекта “Глобус”, 2009. 316 с. (In Russian)]
  15. *Fox G.A.* Practical causal inference for ecoepidemiologists // *J. Toxicol. Environ. Health*. 1991. V. 33. № 4. P. 359–273.  
<https://doi.org/10.1080/15287399109531535>
  16. *Meek M.E., Palermo C.M., Bachman A.N. et al.* Mode of action human relevance (species concordance) framework: Evolution of the Bradford Hill considerations and comparative analysis of weight of evidence // *J. Appl. Toxicol.* 2014. V. 34. № 6. P. 595–606.  
<https://doi.org/10.1002/jat.2984>
  17. *Weed D.L., Gorelic L.S.* The practice of causal inference in cancer epidemiology // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996. V. 5. № 4. P. 303–311.
  18. *Wynder E.L.* Environmental causes of cancer in man // *Med. Clin. North America*. 1956. V. 40. № 3. P. 624–643.  
[https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34556-4](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34556-4)
  19. *Wynder E.L., Day E.* Some thoughts on the causation of chronic disease // *J. Am. Med. Assoc.* 1961. V. 175. № 11. P. 997–999.  
<https://doi.org/10.1001/jama.1961.63040110004014>
  20. *Lilienfeld A.M.* Epidemiological methods and inferences in studies of non-infectious diseases // *Pub. Health Rep.* 1957. V. 72. № 1. P. 51–60.  
<https://doi.org/10.2307/4589685>
  21. *Lilienfeld A.M.* On the methodology of investigations of etiologic factors in chronic diseases: some comments // *J. Chronic Dis.* 1959. V. 10. № 1. P. 41–46.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9681\(59\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0021-9681(59)90016-5)
  22. *Sartwell P.E.* “On the methodology of investigations of etiologic factors in chronic diseases”. Further Comments // *J. Chronic Dis.* 1960. V. 11. № 1. P. 61–63.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9681\(60\)90140-5](https://doi.org/10.1016/0021-9681(60)90140-5)
  23. United States Department of Health, Education and Welfare (USDHEW). *Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service* Publication No. 1103. Washington DC: U.S. Department of Health, Education and Welfare. 1964. 387 p.  
<https://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/nnbbmq.pdf> (Address data 04.07.2019)
  24. *Власов В.В.* Эпидемиология: учебное пособие. 2-е изд., испр. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 464 с. [Vlasov V.V. *Epidemiology*. 2nd Ed., revised. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 464 p. (In Russian)]
  25. *Susser M.* Judgement and causal inference: criteria in epidemiologic studies // *Am. J. Epidemiol.* 1977. V. 105. № 1. P. 1–15. Reprint: *Am. J. Epidemiol.* 1995. V. 141. № 8. P. 701–715.
  26. *Thygesen L.C., Andersen G.S., Andersen H.* A philosophical analysis of the Hill criteria // *J. Epidemiol. Community Health*. 2005. V. 59. № 6. P. 512–516.  
<https://doi.org/10.1136/jech.2004.027524>
  27. *Strom B.L.* Study designs available for pharmacoepidemiology studies // *Pharmacoepidemiology*. 3rd Edition / Ed. B.L. Strom. Baffins Lane, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2000. P. 17–30.
  28. *Friis R.H., Sellers T.A.* *Epidemiology for Public Health Practice*. 5th Ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning. 2014. 804 p.
  29. *Weed D.L., Hursting S.D.* Biologic plausibility in causal inference: current method and practice // *Am. J. Epidemiol.* 1998. V. 147. № 5. P. 415–425.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009466>
  30. *Goodman S.N., Samet J.M.* *Cause and Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th Ed. / Eds M.J. Thun et al. New York: Oxford University Press. Printed by Sheridan Books, Inc., USA, 2018. P. 97–104.
  31. *Egilman D., Kim J., Biklen M.* Proving causation: the use and abuse of medical and scientific evidence inside the courtroom – an epidemiologist’s critique of the ju-

- dicial interpretation of the Daubert ruling // Food Drug Law J. 2003. V. 58. № 2. P. 223–250.
32. *Hollingsworth J.G., Lasker E.G.* The Case against differential diagnosis: Daubert, medical causation. Testimony, and the scientific method // J. Health Law. 2004. V. 37. № 1. P. 85–111.
  33. *Bhopal R.S.* Concepts of Epidemiology: Integrated the ideas, theories, principles and methods of epidemiology. 3rd Ed. Oxford: University Press, 2016. 442 p.
  34. *Fedak K.M., Bernal A., Capshaw Z.A., Gross S.* Applying the Bradford Hill criteria in the 21st century: how data integration has changed causal inference in molecular epidemiology // Emerg. Themes Epidemiol. 2015. V. 12. Art. 14.  
<https://doi.org/10.1186/s12982-015-0037-4>
  35. *Gordis L.* Epidemiology. 5th Ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc., 2014. 392 p.
  36. *Susser M.* Rules of inference in epidemiology // Regul. Toxicol. Pharmacol. 1986. V. 6. № 2. P. 116–128.  
[https://doi.org/10.1016/0273-2300\(86\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0273-2300(86)90029-2)
  37. *Susser M.* The logic of Sir Karl Popper and the practice of epidemiology // Am. J. Epidemiol. 1986. V. 124. № 5. P. 711–718.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114446>
  38. USEPA 2005. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001B. Washington, DC: Risk Assessment Forum. National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, 2005. 166 p.
  39. *Weed D.L.* Epidemiologic evidence and causal inference // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2000. V. 14. № 4. P. 797–807.  
[https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70312-9](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70312-9)
  40. *Becker R.A., Dellarco V., Seed J. et al.* Quantitative weight of evidence to assess confidence in potential modes of action // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2017. V. 86. P. 205–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.017>
  41. *Rothman K.* Modern Epidemiology. 1st Ed. Boston: Little Brown MA., 1986. 358 p.
  42. *Rothman K.J.* Modern Epidemiology. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1998. 737 p.
  43. *Rothman K.J., Greenland S., Poole C., Lash T.L.* Causation and causal inference // Modern Epidemiology / Eds K.J. Rothman, S. Greenland, T.L. Lash. 3rd ed. Philadelphia (PA): Wolters Kluwer, 2008. P. 5–31.
  44. *Rothman K.J.* Inferring causal connection – habit, faith or logic? // Causal inference / Ed. K.J. Rothman. Epidemiology Resources Inc., Mass., USA, 1988. P. 3–12.
  45. *Rothman K., Greenland S.* Hill’s Criteria for Causality // Encyclopedia of Biostatistics, Online. John Wiley & Sons, Ltd., 2005. 4 p.  
<https://www.rtihs.org/sites/default/files/26902%20Rothman%201998%20The%20encyclopedia%20of%20biostatistics.pdf> (address data 04.07.2019)
  46. *Merrill R.M., Frankenfeld C.L., Freeborne N., Mink M.* Behavioral Epidemiology. Principles and Applications. Burlington: Jones & Bartlett Learning, LLC, 2016. 298 p.
  47. *Lagiou P., Adami H.O., Trichopoulos D.* Causality in cancer epidemiology // Eur. J. Epidemiol. 2005. V. 20. № 7. P. 565–574.  
<https://doi.org/10.1007/s10654-005-7968-y>
  48. *Aschengrau A., Seage G.R., III.* Epidemiology in Public Health. 3rd Ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, LLC, 2014. 596 p.
  49. Smoking and reproductive life. The impact of smoking on sexual, reproductive and child health / Eds D. Carter, N. Nathanson, C. Seddon et al. British Medical Association. Board of Science and Education & Tobacco Control Resource Centre, 2004.  
[https://www.rauchfrei-info.de/fileadmin/main/data/Dokumente/Smoking\\_ReproductiveLife.pdf](https://www.rauchfrei-info.de/fileadmin/main/data/Dokumente/Smoking_ReproductiveLife.pdf) (address data 04.07.2019)
  50. USEPA 1998. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/R-95/002F. Washington, DC: Risk Assessment Forum, 1998. 188 p.
  51. *Weed D.L.* Precaution, prevention, and public health ethics // J. Med. Philos. 2004. V. 29. № 3. P. 313–332.  
<https://doi.org/10.1080/03605310490500527>
  52. *Porta M.* Biologic plausibility in causal inference: current method and practice // Am. J. Epidemiol. 1999. V. 150. № 2. P. 217–219.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009984>
  53. *Carbone M., Klein G., Gruber J., Wong M.* Modern criteria to establish human cancer etiology // Cancer Res. 2004. V. 64. № 15. P. 5518–5524.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0255>
  54. *Russo F., Williamson J.* Interpreting causality in the health sciences // Int. Stud. Philos. Sci. 2007. V. 21. № 2. P. 157–170.  
<https://doi.org/10.1080/02698590701498084>
  55. *Cormier S.M., Suter G.W. II, Norton S.B.* Causal characteristics for ecoepidemiology // Hum. Ecol. Risk Assess. 2010. V. 16. № 1. P. 53–73.  
<https://doi.org/10.1080/10807030903459320>
  56. *Hartung T., Luechtefeld T., Maertens A., Kleinsang A.* Integrated testing strategies for safety assessments // ALTEX. 2013. V. 30. № 1. P. 3–18.  
<https://doi.org/10.14573/altex.2013.1.003>
  57. IARC 2006. Internal Report No. 07/001. International Agency for Research on Cancer. Report of the advisory group to plan volume 100: a review of human carcinogenesis. Lyon, 6–8 September 2006. IARC, Lyon, 2007. 17 p. [Принципы, правила и процедуры, используемые МАИР при оценке риска канцерогенности для человека различных факторов: Пер. с англ. // Вопр. онкологии. 2007. Т. 53. № 6. С. 621–641. (In Russian)]
  58. *Fletcher R.H., Fletcher S.W., Wagner E.H.* Clinical Epidemiology: The Essentials. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. [Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины: Пер. с англ. М.: Медиа Сфера, 1998. 352 с. (In Russian)]
  59. *Weed D.L.* On the use of causal criteria // Int. J. Epidemiol. 1997. V. 26. № 6. P. 1137–1141.  
<https://doi.org/10.1093/ije/26.6.1137>
  60. *Kaufman J.S., Poole C.* Looking back on “causal thinking in the health sciences” // Annu. Rev. Public Health. 2000. V. 21. P. 101–119.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.21.1.101>
  61. *Ward A.C.* The role of causal criteria in causal inferences: Bradford Hill’s “aspects of association” // Epi-

- demiol. Perspect. Innov. 2009. V. 6. № 2. 22 p.  
<https://doi.org/10.1186/1742-5573-6-2>
62. *Bruce N., Pope D., Stanistreet D.* Quantitative Methods for Health Research. A Practical Interactive Guide to Epidemiology and Statistics. 2nd Ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2019. 545 p.
  63. *Merrill R.M.* Introduction to Epidemiology. 7th Ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2017. 339 p.
  64. *Webb P., Bain C.* Essential Epidemiology. An Introduction for Students and Health Professionals. 2nd Ed. Cambridge etc.: Cambridge University Press, 2011. 445 p.
  65. *Greenland S.* Relation of probability of causation to relative risk and doubling dose: a methodologic error that has become a social problem // *Am. J. Public Health.* 1999. V. 89. № 8. P. 1166–1169.  
<https://doi.org/10.2105/AJPH.89.8.1166>
  66. *Moraes R., Gerhard P., Andersson L. et al.* Establishing causality between exposure to metals and effects on fish // *Human and Ecological Risk Assessment.* 2003. V. 9. № 1. P. 149–169.  
<https://doi.org/10.1080/713609857>
  67. *Swaen G., van Amelsvoort L.* A weight of evidence approach to causal inference // *J. Clin. Epidemiol.* 2009. V. 62. № 3. P. 270–277.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.06.013>
  68. *Kundi M.* Causality and the interpretation of epidemiologic evidence // *Environ. Health Perspect.* 2006. V. 114. № 7. P. 969–974.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.8297>
  69. *Elwood J.M.* Causal relationship in medicine: a practical system for critical appraisal. New York: Oxford University Press, 1988. 332 p.
  70. *Renton A.* Epidemiology and causation: a realist view // *J. Epidemiol. Community Health.* 1994. V. 48. № 1. P. 79–85.  
<https://doi.org/10.1136/jech.48.1.79>
  71. *Susser M.* What is a cause and how do we know one? A grammar for pragmatic epidemiology // *Am. J. Epidemiol.* 1991. V. 133. № 7. P. 635–648.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115939>
  72. *Angell M.* The interpretation of epidemiologic studies // *N. Engl. J. Med.* 1990. V. 323. № 12. P. 823–825.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199009203231209>
  73. *Coughlin S.S.* Causal Inference and Scientific Paradigms in Epidemiology. Bentham E-book, 2010. 70 p.  
<https://doi.org/10.2174/97816080518161100101>  
<https://ebooks.benthamscience.com/book/9781608051816/>  
 (address data 04.07.2019)
  74. *Rothman K.J.* Epidemiology. An Introduction. 2nd Ed. Oxford etc.: Oxford University Press Inc., 2012. 268 p.
  75. *Lower G.M., Kanarek M.S.* Conceptual/operational criteria of causality: relevance to systematic epidemiologic theory // *Med. Hypotheses.* 1983. V. 11. № 2. P. 217–244.  
[https://doi.org/10.1016/0306-9877\(83\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0306-9877(83)90064-6)
  76. *Martin C.J., Sutton D.G., West C.M., Wright E.G.* The radiobiology/radiation protection interface in health-care // *J. Radiol. Prot.* 2009. V. 29. № 2A. P. A1–A20.  
<https://doi.org/10.1088/0952-4746/29/2A/S01>
  77. *Trott K.R., Rosemann M.* Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, non-threshold dose response model of radiation risk estimation // *Radiat. Environ. Biophys.* 2000. V. 39. № 2. P. 79–87.  
<https://doi.org/10.1007/s004110000047>
  78. *Котеров А.Н., Жаркова Г.П., Бiryukov А.П.* ТанDEM радиационной эпидемиологии и радиобиологии для практики радиационной защиты // *Мед. радиол. и радиац. безопасность.* 2010. Т. 55. № 4. С. 55–84. [*Koterov A.N., Zharkova G.P., Biryukov A.P.* Tandem of radiation epidemiology and radiobiology for practice and radiation protection// *Medical Radiology and Radiation Safety (Moscow).* 2010. V. 55. № 5. P. 48–73. (In Engl.)]
  79. *Preston R.J.* Integrating basic radiobiological science and epidemiological studies: why and how // *Health Phys.* 2015. V. 108. № 2. P. 125–130.
  80. *Westling T.* Male organ and economic growth: does size matter? // *HECER – Helsinki Center of Economic Research. Discussion Paper No. 335.* July 2011. 16 p.  
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/27239/maleorga.pdf> (Address data 04.07.2019)
  81. *Eddy D.M.* The confidence profile method: a Bayesian method for assessing health technologies // *Oper. Res.* 1989. V. 37. № 2. P. 210–228.  
<https://doi.org/10.1287/opre.37.2.210>
  82. *Hoaglin D.C., Hawkins N., Jansen J.P. et al.* Conducting indirect treatment comparisons and network meta-analysis for health care decision making: report of the ISPOR task force on indirect treatment comparisons good research practices: Part 2 // *Value in Health.* 2011. V. 14. P. 429–437.  
<https://doi.org/10.1016/j.jval.2011.01.011>
  83. *Дривотинов Б.В., Апанель Е.Н., Мастыкин А.С.* Основные понятия, принятые в доказательной медицине // *Мед. журн. (Минск).* 2005. № 2. С. 103–107. [*Drivotinov B.V., Apanel E.N., Mastykin A.S.* The basic terms accepted in evidence based medicine // *Medical Journal (Minsk).* 2005. № 2. P. 103–107 (In Russian)]  
<http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/5255> (address data 04.07.2019)
  84. *Lewis M.G., Nair N.S.* Review of applications of Bayesian meta-analysis in systematic reviews // *GJMEDPH.* 2015. V. 4. № 1. 9 p.  
<http://www.gjmedph.com/uploads/R1-Vo4No1.pdf>  
 (address data 04.07.2019)
  85. *Blettner M., Sauerbrei W., Schlehofer B. et al.* Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology // *Int. J. Epidemiol.* 1999. V. 28. № 1. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1093/ije/28.1.1>
  86. *Wald N.J., Morris J.K.* Teleoanalysis: combining data from different types of study // *BMJ.* 2003. V. 327. № 7415. P. 616–618.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.327.7415.616>
  87. *Howick J., Glasziou P., Aronson J.K.* The evolution of evidence hierarchies: what can Bradford Hill's 'guidelines for causation' contribute? // *J. R. Soc. Med.* 2009. V. 102. № 5. P. 186–194.  
<https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.090020>
  88. *Aronson J.K.* Unity from diversity: the evidential use of anecdotal reports of adverse drug reactions and interactions // *J. Eval. Clin. Pract.* 2005. V. 11. № 2. P. 195–208.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2005.00527.x>

89. *Loke Y.K.* Adverse drug reactions // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2012. V. 73. № 6. P. 908–911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04235.x>
90. *Howick J., Glasziou P., Aronson J.K.* Evidence-based mechanistic reasoning // *J. R. Soc. Med.* 2010. V. 103. № 11. P. 433–441. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2010.100146>
91. *Guzelian P.S., Victoroff M.S., Halmes N.C. et al.* Evidence-based toxicology: a comprehensive framework for causation // *Hum. Exp. Toxicol.* 2005. V. 24. № 4. P. 161–201. <https://doi.org/10.1191/0960327105ht517oa>
92. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General Rockville, MD: Office of the Surgeon General, US Public Health Service, 2004. 910 p.
93. *Handbook of Epidemiology.* 2nd Ed. / Eds W. Ahrens, I. Pigeot. New York; Heidelberg; Dordrecht; London: Springer, 2014. 2498 p.
94. *Farr W.* The mortality of cholera in England, 1848–49 // *Vital Statistics: A Memorial Volume of Selections from the Reports and Writings of William Farr* / Ed. N.A. Humphreys. London: Sanitary Institute, 1885. P. 333–351.
95. *Snow J.* On the mode of communication of cholera. London: John Churchill, 1855. 31 p.
96. *Szklo M., Nieto F.J.* *Epidemiology. Beyond the Basics.* 4th Ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2019. 577 p.
97. *Bonita R., Beaglehole R., Kjellstrom T.* *Basic epidemiology.* 2nd Ed. World Health Organization, 2006. 212 p.
98. *Cheever D.W.* The value and fallacy of statistics in the observation of disease // *The Boston Medical and Surgical Journal.* 1861. V. 63. № 24. P. 449–456. <https://doi.org/10.1056/nejm186101240632609>
99. *Rothman K.J., Greenland S.* Causation and causal inference in epidemiology // *Am. J. Public Health.* 2005. V. 95. Suppl 1. P. S144–S150. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.059204>
100. *Phillips A.N., Davey Smith G.* Confounding in epidemiological studies // *Brit. Med. J.* 1993. V. 306. № 870. P. 142. <https://doi.org/10.1136/bmj.306.6870.142-b>
101. *Glaser H.* *Dramatische Medicin. Selbstversuche von Arzten.* Zurich: Orell Furssli, 1959. 246 p. [*Глязер Г.* *Драматическая медицина. Опыты врачей на себе:* Пер. с нем. В. Хорохордина / Предисл. и научн. ред. Б.Д. Петрова. 2-е изд. М.: Молодая гвардия, 1965. 216 с. (In Russian)]
102. DOE 1995. U.S. Department of Energy. Closing the Circle on the Splitting of the Atom // *The Environmental Legacy of Nuclear Weapons Production in the United States and What the Department of Energy is Doing About It.* U.S. Department of Energy, Office of Environmental Management, January 1995. DOE/EM-0266. 106 p. [https://www.energy.gov/sites/prod/files/2014/03/f8/Closing\\_the\\_Circle\\_Report.pdf](https://www.energy.gov/sites/prod/files/2014/03/f8/Closing_the_Circle_Report.pdf) (address data 04.07.2019)
103. ICRP Publication 118. ICRP Statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Annals of the ICRP.* Ed. C.H. Clement. Amsterdam–New York: Elsevier, 2012. 325 p.
104. *Clement C.* *The International Framework for Radiation Safety. History, Science, Philosophy and Practice* // ICRP. Radiological Protection Institute of Ireland. Dublin, 2009, August 18. Presentation. 45 slides. [https://www.epa.ie/pubs/reports/radiation/RPII\\_I-CRP\\_Int\\_Frame\\_Rad\\_09.pdf](https://www.epa.ie/pubs/reports/radiation/RPII_I-CRP_Int_Frame_Rad_09.pdf) (address data 04.07.2019)
105. *Tubiana M.* Radiation risks in perspective: radio-induced cancer among cancer risks // *The Effects of Low and Very Low Doses of Ionizing Radiation on Human Health* / Ed. WONUC. Elsevier Science B.V., 2000. P. 3–24. [*Tubiana M.* Радиационный риск в перспективе: сравнение риска индукции радиогенного рака с риском канцерогенеза вследствие других факторов // Биологические и эпидемиологические эффекты облучения в малых дозах и с низкой мощностью дозы: Мат. I симп. WONUC / Пер. с англ. и ред. А.Н. Котеров. М., 2003. С. 19–56. (In Russian)]
106. *Macklis R.M.* Radithor and the era of mild radium therapy // *JAMA.* 1990. V. 264. № 5. P. 614–618. <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03450050072031>
107. *Jorgensen T.J.* *Strange Glow. The Story of Radiation.* Princeton and Oxford: Princeton University Press, 2016. 490 p.
108. *Brodsky A., Kathren R.L., Willis C.A.* History of the medical uses of radiation: regulatory and voluntary standards of protection // *Health Phys.* 1995. V. 69. № 5. P. 783–823. <https://doi.org/10.1097/00004032-199511000-00012>
109. *Mottram J.C., Russ S.* Lymphopenia following exposures of rats to “soft” X-rays and the beta-rays of radium // *J. Exp. Med.* 1921. V. 34. № 3. P. 271–273. <https://doi.org/10.1084/jem.34.3.271>
110. *Sugiura K., Failla G.* Some effects of radium radiations on white mice // *J. Gen. Physiol.* 1922. V. 4. № 4. P. 423–436. <https://doi.org/10.1085/jgp.4.4.423>
111. *Lazarus-Barlow W.S.* On the disappearance of insoluble radium salts from the bodies of mice after subcutaneous injection // *Archives of the Middlesex Hospital.* 1913. V. 30. P. 92–94.
112. *Lazarus-Barlow W.C.* The causation of cancer // *Brit. Med. J.* 1924. V. 1. № 3301. P. 647–648.
113. *Orr C.P.* Eben M. Byers: the effect of gamma rays on amateur golf, modern medicine and the FDA // *Heritage. Allegheny Cemetery.* 2004. V. 13. № 1. P. 6–7. [http://www.alleghenycemetery.com/images/newsletter/newsletter\\_XIII\\_1.pdf](http://www.alleghenycemetery.com/images/newsletter/newsletter_XIII_1.pdf) (address data 01.07.2019)
114. Lock, Stock, and History. Vita Radium Suppositories // Site “Pinterest”. <https://www.orau.org/ptp/collection/quackcures/rad-sup.htm> (address data 04.07.2019)
115. Vita Radium Suppositories (ca.1930). Produced by the Home Products Company of Denver, Colorado. Donated by Joel Lubenau. <https://www.orau.org/ptp/collection/quackcures/rad-sup.htm> (address data 04.07.2019)
116. *Белозерский Г.Н.* Радиационная экология: Учебник для бакалавриата и магистратуры. 2-е изд., пер. и доп. М.: Изд-во Юрайт, 2019. 418 с. [*Belozerskiy G.N.* Радиационная экология: Учебник для бакалавриата и магистратуры. 2-е изд., пер. и доп. М.: Изд-во Юрайт, 2019. 418 с.]

- sky G.N.* Radiation Ecology: Textbook for undergraduate and graduate. 2nd Ed., Trans. and add. M.: Yurait Publishing House, 2019. 418 p. (In Russian)]
117. *Frame P. Kolb W.* Living with Radiation: the First Hundred Years. 2nd Ed. Maryland: Syntec, Inc. 2000; and: “Gilbert U-238 Atomic Energy Lab (1950–1951)” // Oak Ridge Associated Universities, 1999. <https://www.ornl.gov/ptp/collection/atomic/toys/atomic.htm> (address data 04.07.2019)
  118. UNSCEAR 2001. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex Hereditary effects of radiation. New York: United Nations, 2001. P. 5–160.
  119. *Котеров А.Н.* Основной вопрос радиационной генетики: существуют ли у людей радиационные мутанты? // Актуальная радиобиология: Курс лекций / Л.А. Ильин, Л.М. Рождественский, А.Н. Котеров, Н.М. Борисов. Высшая школа физики / Ред. коллегия серии: В.П. Смирнов (пред.) и др. Вып. 4. М.: Изд. дом МЭИ, 2015. С. 133–158. [*Kotero A.N.* The main question of radiation genetics: do people have radiation mutants? // Actual Radiobiology: a Course of Lectures / Ilyin L.A., Rozhdestvensky L.M., Kotero A.N., Borisov N.M. High School of Physics / Ed. Board Series by V.P. Smirnov (chairman) et al. Issue 4. M.: Moscow Power Engineering Institute Publishing House, 2015. P. 133–158. (In Russian)]
  120. *Котеров А.Н., Бiryukov А.П.* Дети ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции. 1. Оценка принципиальной возможности зарегистрировать радиационные эффекты // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2012. Т. 57. № 1. С. 58–79. [*Kotero A.N., Biryukov A.P.* The offspring of liquidators of Chernobyl Atomic Power Station accident. 1. The estimation of the basic opportunity to register of radiation effect // Medical Radiology and Radiation Safety, Moscow). 2012. V. 57. № 1. P. 58–79. (In Russian. Engl. abstr.)]
  121. *Котеров А.Н., Бiryukov А.П.* Дети участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции. 2. Частота отклонений и патологий и их связь с нерадиационными факторами // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2012. Т. 57. № 2. С. 51–77. [*Kotero A.N., Biryukov A.P.* The offspring of liquidators of Chernobyl Atomic Power Station accident. 2. The frequency of anomalies and pathologies and its connection to non-radiation factors // Medical Radiology and Radiation Safety, Moscow). 2012. V. 57. № 2. P. 51–77. (In Russian. Engl. abstr.)]
  122. ICRP Publication 103. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP / Ed. J. Valentin. Amsterdam–New York: Elsevier, 2007. 329 p.
  123. *Захарова М.Л., Безлепкин В.Г., Кириллова Е.Н. и др.* Генетический материал радиобиологического репозитория тканей человека и некоторые результаты его исследования // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2010. Т. 55. № 5. С. 5–13. [*Zakharova M.L., Bezlepkin V.G., Kirillova E.N. et al.* Radiobiology human tissue repository genetic material and the certain results of its study // Medical Radiology and Radiation Safety, Moscow). 2010 V. 55. № 3. P. 27–45. (In Russian. Engl. abstr.)]
  124. *Безлепкин В.Г., Кириллова Е.Н., Захарова М.Л. и др.* Отдаленные и трансгенерационные молекулярно-генетические эффекты пролонгированного воздействия ионизирующей радиации у работников предприятия ядерной промышленности // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 1. С. 20–32. [*Bezlepkin V.G., Kirillova E.N., Zakharova M.L. et al.* Delayed and transgenerational molecular and genetic effects of prolonged influence of ionizing radiation in nuclear plant workers // Radiation biology. Radioecology, Moscow). 2011. V. 51. № 1. P. 20–32. (In Russian. Engl. abstr. PubMed.)]
  125. *Kuzmina N.S., Myazin A.E., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V.* The study of hypermethylation in irradiated parents and their children blood leukocytes // Cent. Eur. J. Biol. 2014. V. 9. № 10. P. 941–950. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0333-y>
  126. *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. V. 146. P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
  127. *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. V. 234. P. 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.039>
  128. *Diggle G.E.* Thalidomide: 40 years on // Int. J. Clin. Pract. 2001. V. 55. № 9. P. 627–631.
  129. *Jacobson R.M., Feinstein A.R.* Oxygen as a cause of blindness in premature infants: “autopsy” of a decade of errors in clinical epidemiologic research // J. Clin. Epidemiol. 1992. V. 45. № 11. P. 1265–1287.
  130. *Lacchetti C., Ioannidis J., Guyatt G.* Surprising results of randomized trials // User’s Guides to the Medical Literature. A Manual for Evidence-Based Clinical Practice. Eds G. Guyatt, D. Rennie, M.O. Meade, D.J. Cook. JAMA Evidence. The Evidence-Based Medicine Working Group. 2nd Ed. New York etc.: McGraw Hill Medical, 2008. P. 113–151.
  131. *Howick J.* The Philosophy of Evidence-Based Medicine. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. 248 p.
  132. *Nguyen T.K., Nguyen E.K., Warner A. et al.* Failed randomized clinical trials in Radiation Oncology: what can we learn? // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2018. V. 101. № 5. P. 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.04.030>
  133. *Krauss A.* Why all randomised controlled trials produce biased results // Ann Med. 2018. V. 50. №4. P. 312–322. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1453233>
  134. *Cartwright N.* Are RCTs the gold standard? // Biosocieties. 2007. V. 2. № 1. P. 11–20. <https://doi.org/10.1017/S1745855207005029>
  135. *Cartwright N., Munro E.* The limitations of randomized controlled trials in predicting effectiveness // J. Eval. Clin. Pract. 2010. V. 16. № 2. P. 260–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2010.01382.x>
  136. *Grossman J., Mackenzie F.* The randomized controlled trial: gold standard, or merely standard? // Perspect. Biol. Med. 2005. V. 48. № 4. P. 516–534. <https://doi.org/10.1353/pbm.2005.0092>

137. *Peto R., Doll R., Buckley J.D., Sporn M.B.* Can dietary betacarotene materially reduce human cancer rates? // *Nature*. 1981. V. 290. № 5803. P. 201–208. <https://doi.org/10.1038/290201a0>
138. *User's Guides to the Medical Literature. Essentials of Evidence-Base Clinical Practice / Eds G. Guyatt, M.O. Meade, D. Rennie, P.R. Lee, D.J. Cook.* JAMA Evidence. The Evidence-Based Medicine Working Group. 2nd Ed. New York etc.: McGraw Hill Medical, 2008. 359 p.
139. *Stampfer M.J., Colditz G.A.* Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence // *Prev. Med.* 1991. V. 20. № 1. P. 47–63. [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(91\)90006-p](https://doi.org/10.1016/0091-7435(91)90006-p)
140. *Petitti D.B., Perlman J.A., Sidney S.* Postmenopausal estrogen use and heart disease // *N. Engl. J. Med.* 1986. V. 315. № 2. P. 131–132. <https://doi.org/10.1056/NEJM198607103150213>
141. *Petitti D.B., Perlman J.A., Sidney S.* Noncontraceptive estrogens and mortality: long-term follow-up of women in the Walnut Creek Study // *Obstet. Gynecol.* 1987. V. 70. № 3. Pt. 1. P. 289–293.
142. *Gage S.H., Munafò M.R., Davey Smith G.* Causal inference in developmental origins of health and disease (DOHaD) research // *Annu. Rev. Psychol.* 2016. V. 67. P. 567–585. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122414-033352>
143. *Lobo R.A.* Hormone-replacement therapy: current thinking // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017. V. 13. № 4. P. 220–231. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.164>
144. *Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L. et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial // *JAMA*. 2002. V. 288. № 3. P. 321–333. <https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>
145. *Dalton S.O., Boesen E.H., Ross L. et al.* Mind and cancer. do psychological factors cause cancer? // *Eur. J. Cancer*. 2002. V. 38. № 10. P. 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00099-0)
146. *Johansen C.* Mind as a risk factor for cancer—some comments // *Psychooncology*. 2012. V. 21. № 9. P. 922–926. <https://doi.org/10.1002/pon.3143>
147. *Heikkilä K., Nyberg S.T., Theorell T. et al.* Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women // *Brit. Med. J.* 2013. V. 346. Art. f165. 10 p. <https://doi.org/10.1136/bmj.f165>
148. *Psychological Stress and Cancer // National Cancer Institute at the National Institute of Health. U.S. Department of Health and Human Services, 2012.* <https://www.cancer.gov/about-cancer/coping/feelings/stress-fact-sheet> (address data 04.07.2019)
149. *Does stress affect cancer risk? Together we will beat cancer.* Cancer Research UK. 2018. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/cancer-controversies/stress> (address data 04.07.2019)
150. *Antonova L., Aronson K., Mueller C.R.* Stress and breast cancer: from epidemiology to molecular biology // *Breast Cancer Res.* 2011. V. 13. № 2. Art. 208. 15 p. <https://doi.org/10.1186/bcr2836>
151. *Hjerl K., Andersen E.W., Keiding N. et al.* Breast cancer risk among women with psychiatric admission with affective or neurotic disorders: a nationwide cohort study in Denmark // *Br. J. Cancer*. 1999. V. 81. № 5. P. 907–911. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690785>
152. *Reiche E.M., Nunes S.O., Morimoto H.K.* Stress, depression, the immune system, and cancer // *Lancet Oncol.* 2004. V. 5. № 10. P. 617–625. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9)
153. *Soung N.K., Kim B.Y.* Psychological stress and cancer // *J. Anal. Sci. Technol.* 2015. V. 6. Art. 30. 6 p. <https://doi.org/10.1186/s40543-015-0070-5>
154. *Koterov A.N., Biryukov A.P.* The possibility of determining of anomalies and pathologies in the offspring of liquidators of Chernobyl accident by the non-radiation factors // *Int. J. Low Radiat. (Paris)*. 2011. V. 8. № 4. P. 256–312. <https://doi.org/10.1504/IJLR.2011.046529>
155. *Antoni M.H., Lutgendorf S.K., Cole S.W. et al.* The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 3. P. 240–248. <https://doi.org/10.1038/nrc1820>
156. *Li P., Huang J., Wu H. et al.* Impact of lifestyle and psychological stress on the development of early onset breast cancer // *Medicine (Baltimore)*. 2016. V. 95. № 50. Article e5529. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005529>
157. *Ross L., Boesen E.H., Dalton S.O., Johansen C.* Mind and cancer: does psychosocial intervention improve survival and psychological well-being? // *Eur. J. Cancer*. 2002. V. 38. № 11. P. 1447–1357. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00126-0](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00126-0)
158. *IARC 2014. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Internal Report 14/002 // Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during 2015–2019. Lyon, France, 2014. Updated 2018. 54 p.*
159. *Gotzsche P.C.* *Deadly Medicines and Organised Crime. How Big Pharma has Corrupted Healthcare.* London: Radcliffe Publishing, 2013. 310 p. [*Гемме П.* Смертельно опасные лекарства и организованная преступность: как большая фарма коррумпировала здравоохранение: Пер. с англ. Л.Е. Зиганшиной. М.: Изд-во “Э”, 2016. 464 с. (In Russian)]
160. *Davey Smith G.* Data dredging, bias, or confounding. They can all get you into the BMJ and the Friday papers // *Brit. Med. J.* 2002. V. 325. № 7378. P. 1437–1438. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7378.1437>
161. *Feinstein A.R.* Clinical biostatistics. XLVII. Scientific standards vs. statistical associations and biologic logic in the analysis of causation // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1979. V. 25. № 4. P. 481–492. <https://doi.org/10.1002/cpt1979254481>
162. *Knottnerus J.A.* The JECH gallery. Alvan R. Feinstein // *J. Epidemiol. Community Health*. 2002. V. 56. № 5.

- P. 322.  
<https://doi.org/10.1136/jech.56.5.322>
163. *Feinstein A.R.* Meta-analysis: statistical alchemy for the 21st century // *J. Clin. Epidemiol.* 1995. V. 48. № 1. P. 71–79.  
[https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)00110-C](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)00110-C)
164. USEPA 2006. A Framework for Assessing Health Risks of Environmental Exposures to Children. EPA/600/R-05/093F. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, 2006. 145 p.
165. IARC 1987. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Volumes 1 to 42, Lyon 1987. 449 p.
166. IARC 2012. Radiation. A review of human carcinogens. V. 100 D. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France, 2012. 341 p.
167. *Rothman K.J., Poole C.* A strengthening programme for weak associations // *Int. J. Epidemiol.* 1988. V. 17. № 4. P. 955–959.
168. *Greenland S., Robins J.M.* Identifiability, exchangeability, and epidemiological confounding // *Int. J. Epidemiol.* 1986. V. 15. № 3. P. 413–419. Репринт: *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2009. V. 6. № 4.  
<https://doi.org/10.1186/1742-5573-6-4>
169. *Frick U., Rehm J.* Can we establish causality with statistical analyses? The example of Epidemiology // *Statistics and Causality: Methods for Applied Empirical Research* / Eds W. Wiedermann, A. von Eye. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016. P. 407–431.
170. *Andersen H.* History and philosophy of modern epidemiology. Based on a talk delivered at the &HPS Conference, Pittsburgh, October 2007. <http://philsci-archival.pitt.edu/4159/> (address data 04.07.2019)
171. *Charlton B.G.* Attribution of causation in epidemiology: chain or mosaic? // *J. Clin. Epidemiol.* 1996. V. 49. № 1. P. 105–107.  
[https://doi.org/10.1016/0895-4356\(95\)00030-5](https://doi.org/10.1016/0895-4356(95)00030-5)
172. *Charlton B.G.* The Zombie science of evidence-based medicine: a personal retrospective. A commentary on Djulbegovic, B., Guyatt, G.H. & Ashcroft, R.E. (2009). *Cancer Control*, 16, 158–168 // *J. Eval. Clin. Pract.* 2009. V. 15. № 6. P. 930–934.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2009.01267.x>
173. *Charlton B.G.* Are you an honest scientist? Truthfulness in science should be an iron law, not a vague aspiration // *Med. Hypotheses*. 2009. V. 73. № 5. P. 633–635.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.05.009>
174. *Charlton B.G.* The cancer of bureaucracy: how it will destroy science, medicine, education; and eventually everything else // *Med. Hypotheses*. 2010. V. 74. № 6. P. 961–965.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.11.038>
175. *Rose S.P.R.* *Molecules and Minds*. Philadelphia: Milton Keynes, Open University Press, 1987. 144 p.
176. *Charlton B.G.* A critique of biological psychiatry // *Psychol. Med.* 1990. V. 20. № 1. P. 3–6.
177. *Fujimara J.H., Chou D.Y.* Dissent in science: Styles of scientific practice and the controversy over the cause of AIDS // *Social. Sci. Mecl.* 1994. V. 38. № 8. P. 1017–1036.
178. *Parascandola M., Weed D.L.* Causation in epidemiology // *J. Epidemiol. Community Health*. 2001. V. 55. № 12. P. 905–912.  
<https://doi.org/10.1136/jech.55.12.905>
179. *Arnett J.C.* The EPA’s Fine Particulate Matter (PM2.5) Standards, lung disease, and mortality: a failure of epidemiology // *Advancing Liberty From the Economy to Ecology*. 2006. № 4. 17 p.
180. *Bluming A.Z., Tavris C.* Hormone replacement therapy: real concerns and false alarms // *Cancer J.* 2009. V. 15. № 2. P. 93–104.  
<https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31819e332a>; and: *Bluming A.* Hormone replacement therapy. Judgment Day. What should we know? Presentation. International Symposium on Understanding Health Benefits and Risks. Johns Hopkins University, May 28, 2009. 104 slides.  
<https://jscholarship.library.jhu.edu/handle/1774.2/33639> (address data 04.07.2019)
181. *Morabia A.* Hume, Mill, Hill, and the sui generis epidemiologic approach to causal inference // *Am. J. Epidemiol.* 2013. V. 178. № 10. P. 1526–1532.  
<https://doi.org/10.1093/aje/kwt223>
182. *Peeters P.J.H.L.* Etiological studies in complex diseases // *Division of Pharmacoepidemiology and Clinical Pharmacology of the Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, as part of the CARING consortium (Cancer Risk and INsulin analogues)*. The CARING project has received funding from the European Community’s 7th Framework Programme under grant agreement no 282526. 2016. 246 p.
183. *Goodman K.J., Phillips C.V.* Hill’s criteria of causation // *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science* / Eds B.S. Everitt, D.C. Howell. V. 2. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. P. 818–820.
184. *Phillips C.V.* Gateway effects: why the cited evidence does not support their existence for low-risk tobacco products (and what evidence would) // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015. V. 12. № 5. P. 5439–5464.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph120505439>
185. Site “Tobacco Tactics”. Carl V Phillips.  
[https://www.tobaccotactics.org/index.php/Carl\\_V\\_Phillips](https://www.tobaccotactics.org/index.php/Carl_V_Phillips) (address data 04.07.2019)
186. *Gori G.B.* Epidemiologic evidence in public and legal policy: reality or metaphor? *Critical Legal Issues*. Washington: Washington Legal Foundation. Working Paper Series No. 124, 2004. 33 p.  
<https://s3.us-east-2.amazonaws.com/washlegal-uploads/upload/GoriWP.pdf> (address data 08.07.2019)
187. *Greenland S., Brumback B.* An overview of relations among causal modelling methods // *Int. J. Epidemiol.* 2002. V. 31. № 5. P. 1030–1037.  
<https://doi.org/10.1093/ije/31.5.1030>
188. *Phillips C.V.* Quantifying and reporting uncertainty from systematic errors // *Epidemiology*. 2003. V. 14. № 4. P. 459–466.  
<https://doi.org/10.1097/01.ede.0000072106.65262.ae>

189. Phillips C.V., LaPole L.M. Quantifying errors without random sampling // BMC Med. Res. Methodol. 2003. V. 3. Art. 9. 10 p. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-3-9>
190. Phillips C.V., Goodman K.J. The missed lessons of Sir Austin Bradford Hill // Epidemiologic Perspectives & Innovations. 2004. V. 1. Art. 3. 5 p. <https://doi.org/10.1186/1742-5573-1-3>
191. Terris M. The Society for Epidemiologic Research and the future of epidemiology // J. Public Health Policy. 1993. V. 14. № 2. P. 137–148. <https://doi.org/10.2307/3342960>

## Hill's Criteria “Biological Plausibility”. Integration of Data from Various Disciplines for Epidemiology and Radiation Epidemiology

A. N. Koterov<sup>a,#</sup>, L. N. Ushenkov<sup>a</sup>, and A. P. Biryukov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>#</sup> E-mail: [govorilga@inbox.ru](mailto:govorilga@inbox.ru)

In the review the various aspects of “Biological plausibility” criterion, sometimes replaced by the “Coherence” criterion (consistency with well-known medical and biological knowledge) are considered. The importance of the criterion for epidemiological evidence of causation, especially for such disciplines (ecology, toxicology, carcinogenesis), in which there are difficulties not only to perform of experiments, but even to observe the effect, is noted. Only statistical approaches in epidemiology are incapable to prove the true causality for association (possibly the effect of chances, confounders, biases and reverse causation). Without knowledge of the biological mechanism and a plausible model, such relationship (especially for weak associations) cannot be regarded as confirmation of the true causation of the effect of the factor. The essence of the criterion is mean the integration of data from various biomedical disciplines, including experiments on animals and *in vitro*. There are three (Weed D.L., Hursting S.D., 1998) and four (Susser M., 1977; 1986) levels of attaining biological plausibility and coherence with existing knowledge. The methodologies for integrating data from various disciplines through Bayesian analysis (Bayesian meta-analysis) based on Weight of Evidence (WoE) and teleoanalysis are considered. The latter is a combination of data from different types of studies to quantify the causal relationship between two such associations, each of which can be proved, but to determine the relationship between the causality of the first and the final effect of the second is difficult for several reasons, including an ethical plan. The approach by teleoanalysis seems doubtful. Despite the need for the criterion “Biological plausibility”, it, like almost all of Hill's criteria (except for “Temporal”) is neither necessary nor sufficient for evidence. Examples are presented (including the effects of radiation) which show first, that “Biological plausibility” depends upon the biological knowledge on the day, and, second, that there are real, but seemingly implausible associations, as well as vice versa. This is base for criticism by some authors (A.R. Feinstein; K.J. Rothman and S. Greenland; B.G. Charlton; K. Goodman and C.V. Phillips) both specifically for the criterion “Biological plausibility” and the entire inductive approach based on causal criteria. However, the “Biological plausibility” criterion remains important for proving causality in epidemiological studies, especially for those disciplines that public health relies on in making preventive decisions and developing safety standards.

**Keywords:** causality criterion ‘Biological plausibility’, Weight of Evidence, integration of data from biomedical disciplines, Bayesian meta-analysis, teleoanalysis

## РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ИССЛЕДОВАНИЯ *in vitro* И *in vivo*

© 2020 г. Н. С. Кузьмина\*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

\*E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 01.06.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Рассматриваются феноменологические аспекты и механизмы нарушений метилирования ДНК (изменения тотального уровня метилирования ДНК и повторяющихся элементов генома, локус-специфические нарушения метилирования, потеря импринтинга), индуцированных радиацией в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также в организме человека. Приведены результаты оценки связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Хотя установлено, что радиорезистентный фенотип таких клеток ассоциирован с гиперметилованием промоторов множества генов, механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование, чтобы увеличить повреждаемость опухолевых клеток, приводящую их к гибели. Выявлена сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немишеных эффектов радиации, как геномная нестабильность и эффект “свидетеля”. Обсуждается потенциальная значимость изучения изменений метилирования ДНК у облученных лиц с целью выявления индивидов с преждевременным старением и повышенным риском развития возраст-ассоциированной патологии.

**Ключевые слова:** радиация, исследования *in vitro* и *in vivo*, гипер-/гипометилирование ДНК, CpG-островки, преждевременное старение

**DOI:** 10.31857/S0869803120050070

Интенсивное развитие атомной энергетики, науки и ядерной медицины приводит к росту числа людей, подвергающихся воздействию радиационного фактора в процессе профессиональной деятельности, диагностических и лечебных мероприятий, а также в результате техногенных аварий на объектах, использующих источники ионизирующих излучений. Учитывая постулированное в радиобиологии ускоренное старение, индуцированное облучением [1], все эти контингенты лиц относятся к группе риска по преждевременной манифестации возраст-ассоциированных заболеваний. Однако разработка системы превентивной диагностики этих патологий имеет ряд сложностей. Во-первых, сами по себе результаты широкогеномных исследований (GWAS — Genome Wide Association Studies), а именно анализ совокупности аллельных вариантов для множества “топовых” SNP-единичных нуклеотидных замен, проявивших каждый в отдельности связь с риском развития той или иной патологии, к сожалению, объясняет, как правило, менее 10% наблюдаемой наследуемости ряда мультифакториальных заболеваний, в том числе ассоциированных с возрастом (злокачественные новообра-

зования, сахарный диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания и др.) [2, 3]. Во-вторых, общеизвестны мишеные и немишеные гентоксические эффекты радиации, наблюдаемые в отдаленный период после облучения организма [4–9]. И хотя однозначно ясно, что повреждения генома не могут не сказаться на функции клетки и организма в целом, отсутствуют явные доказательства их связи с индукцией тех или иных возрастных патологий [10]. В то же время последние достижения в области эпигенетики старения и возраст-ассоциированных заболеваний, связанные с разработкой высокозначимой модели оценки биологического возраста индивида [11–15], позволяющей выявлять лиц с преждевременным старением, дают надежду на решение вышеизложенной проблемы. Поэтому изучение закономерностей индукции эпигенетических изменений в организме, подвергшемся радиационному воздействию, является важным и актуальным аспектом оценки отдаленных последствий облучения.

В данной статье рассматриваются феноменологические аспекты и механизмы нарушений метилирования ДНК — ключевой эпигенетической модификации генома, индуцированных радиаци-

ей в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также в организме человека. Приведены результаты оценки связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Рассмотрена сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немитических эффектов радиации, как геномная нестабильность и эффект “свидетеля”. Обсуждается потенциальная значимость изучения нарушений метилирования ДНК у облученных лиц с целью выявления индивидов с преждевременным старением и повышенным риском развития возраст-ассоциированной патологии.

### ДНК-МЕТИЛИРОВАНИЕ КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

**Сайты метилирования.** Как известно, ДНК-метилирование – эпигенетическая модификация генома, играющая ключевую роль в регуляции многих биологических процессов [16–18]. Сайтами метилирования ДНК в геноме человека являются, преимущественно, CpG-динуклеотиды. За счет того, что 5-метилцитозин склонен к реакции деаминарования с образованием тимина, цитозин характеризуется высокой частотой мутирования в CpG-контексте (CG>TG), а наиболее распространенный однонуклеотидный полиморфизм в геноме человека – это замена цитозина на тимин (C>T). Так, эволюционно сложилось, что наблюдаемая частота CpG-динуклеотидов в несколько раз ниже ожидаемой [19, 20]. В геноме человека 5-метилцитозин составляет около 1% всех нуклеотидов в ДНК, а метилированное состояние характерно для 70% CpG-динуклеотидов. Большинство метилированных цитозинов локализовано в диспергированных (*LTR*, *LINE*, *SINE*, *Alu*) и tandemных повторах (сателлитная ДНК), которые составляют, по крайней мере, половину человеческого генома. Такое эпигенетическое маркирование защищает геном от инсерционного мутагенеза и рекомбинаций ДНК [16, 21–24].

**CpG-островки.** Неметилированные CpG-динуклеотиды представлены, в основном, в CpG-островках, и приблизительно 60% этих элементов генома ассоциированы с промоторами генов, абсолютное большинство которых постоянно экспрессируются (гены “домашнего хозяйства”). Остальные 40% CpG-островков удалены от сайтов старта транскрипции, являются внутригенными или межгенными и называются “орфанные CpG-островки”, так как они не ассоциированы с соответствующими промоторами, но выполняют похожие функции [16, 18]. В CpG-островках частота CpG-динуклеотидов в 7–10 раз выше (приблизительно 1 : 10–20), а уровень CG>TG почти в 7 раз ниже, чем в других регионах генома [24].

Следует подчеркнуть, что метилирование CpG-динуклеотидов промоторов генов сопряжено с подавлением транскрипции, но не элонгации. Внутригенные CpG-островки в большей степени подвержены метилированию, блокирующему использование альтернативных промоторов. Большая роль в регуляции экспрессии некодирующих РНК (нкРНК, англ. ncRNA), энхансерной активности, РНК процессинга (альтернативные сайты сплайсинга и полиаденилирования) отводится метилированию внутригенных CpG [25, 26].

Как правило, метилирование CpG-островков промоторов часто рассматривается как один из механизмов генного сайленсинга, опосредованного протеинами, содержащими метил-CpG-связывающий домен (MBD) или ассоциированное с изменением эффективности связывания позитивных и негативных факторов транскрипции (TFs) с их сайтами узнавания. Однако показано, что отсутствие метилирования не обязательно сопряжено с активным состоянием гена, а подавление экспрессии локуса может быть обеспечено другими эпигенетическими механизмами [25].

### РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

#### *Экспериментальные исследования in vitro*

**Изменения тотального уровня метилирования ДНК.** Еще в 70–80-е годы прошлого столетия были получены первые экспериментальные данные, свидетельствующие о реальности индукции радиацией изменений метилирования генома, зарегистрированных при оценке тотального уровня 5-метилцитозина. Так, показано, что воздействие на *Escherichia coli* 15T<sup>-</sup> (555-7) УФ-света и рентгеновского излучения приводит к увеличению метилирования вновь синтезируемой ДНК (метод основан на включении L-methyl-<sup>3</sup>H methionine в новосинтезированную ДНК) на 25 и 15% соответственно, при этом дополнительное включение метильных групп или деметилирование родительской ДНК отсутствует [27]. Воздействие  $\gamma$ -излучения <sup>60</sup>Co в дозах 0.5–10 Гр на клетки четырех линий (Chinese Hamster Ovary – CHO, Chinese hamster lung fibroblasts – V79A03, human HeLa – S-3, клетки мышины нейробластомы – C-1300N1E-115) приводило к глобальному гипометилированию ДНК, выявляемому через 24, 48 и 72 ч после облучения (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии – HPLC). Выявленная эпигенетическая модификация сопровождалась снижением активности ДНК-метилтрансфераз [28]. Однако изменения метилирования не выявлены в эксперименте других исследователей, а именно, при воздействии рентгеновского излучения (10 Гр) на мышинные эмбриональные клетки ли-

нии m5S/1M и на клетки китайского хомячка CHO/K1 [29].

Проведено изучение изменений паттерна метилирования после воздействия X-лучей (2 Гр) на лимфобластоидные клетки человека радиочувствительной ТК6 (нормальный генотип по гену *p53*) и радиорезистентной WTK1 (мутантный генотип по гену *p53*, высокая эффективность рекомбинационной репарации) линий. Исходный уровень 5-метилцитозина был выше в WTK1 клетках по сравнению с ТК6 клетками. В обеих клеточных линиях выявлено радиационно-индуцированное гипометилирование генома в первые 2–8 ч после облучения (иммуоферментный метод ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). В целом в радиорезистентных клетках эффекты гипометилирования и снижения экспрессии генов метилтрансфераз *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, индуцированные облучением, были более выражены. Транскрипция *TET1* гена, кодирующего фермент, конвертирующий 5-метилцитозин геномной ДНК в 5-гидроксиметилцитозин (стадия деметилирования ДНК), была существенно повышена через 24 ч после радиационного воздействия в обеих клеточных линиях, однако наибольший эффект наблюдался для ТК6 клеток [30].

Еще ранее было показано, что *p53* участвует в эпигенетической регуляции генома. В частности, выявлено, что *p53*, формируя комплекс с Sp1 и модификаторами хроматина в области промотора гена *DNMT1*, приводит к репрессии этого локуса [31]. Выявлено, что делеция *p53* приводит к увеличению транскрипции мРНК *DNMT1* локуса [32]. Кроме того, показано, что *p53* приводит к супрессии гена гистоновой метилтрансферазы *EZH2* [33]. Считается, что *p53* контролирует экспрессию *DNMT1* через прямое связывание с ДНК. Воздействие ионизирующей радиации ослабляет это связывание, приводя к увеличению уровня *DNMT1* [32].

Показано, что облучение нормальных фибробластов человека в дозах 2 и 4 Гр (X-лучи) приводит к статистически незначимому снижению общего уровня метилированных цитозинов (метод ELISA) через 6 ч после воздействия. Существенные различия ( $p = 0.04$ ) обнаруживались только через 24 ч после воздействия облучения на клетки в дозе 2 Гр [34].

*Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК.* Так как диспергированные и tandemные повторы составляют, по крайней мере, половину генома человека, их эпигенетический статус часто рассматривают как показатель тотального метилирования генома. Так, в уже упомянутой работе [34] не выявлено (бисульфитное пиросеквенирование) значимых различий между уровнями метилирования *LINE-1*, а также центромержной  $\alpha$ -сателлитной ДНК, в облученных

(X-лучи, 2 и 4 Гр) и необлученных нормальных фибробластах человека. Только уровень метилирования *ALU* повторов возрастал ( $p = 0.01$ ) через 6 ч после радиационного воздействия в дозе 4 Гр. Кроме того, поклеточный анализ эпигенома не выявил повышенной вариабельности метилирования повторов в облученных клетках по сравнению с интактными.

При фракционированном воздействии  $\gamma$ -излучения  $^{137}\text{Cs}$  в суммарной дозе 10 и 20 Гр (1–2 нед, 5 фракций в неделю по 2 Гр) на клетки рака молочной железы (линия MCF7) не выявлено (масс-спектрометрия) статистически значимых различий в уровне метилирования повторов (*LINE-1*, *Alu*, *LTR*, сателлитная ДНК) в облученных и необлученных клетках, а восстановление способности клеток к делению (14 дней после облучения) не сопровождалось снижением общего уровня метилирования ДНК [35].

*Локус-специфические изменения метилирования ДНК.* Выявлено (комбинация методов MIRA – methylated-CpG island recovery assay и microarray) незначительное количество изменений в метилировании генома нормальных клеток человека (фибробластов HFBs и клеток бронхиального эпителия NHBEc) через 7 дней после острого воздействия  $\gamma$ -излучения  $^{137}\text{Cs}$  в дозах 0.1–4 Гр. Однако наиболее выраженные радиационно-индуцированные модификации генов *CLEC18A*, *SDHALP1*, *ZCCHC16* в фибробластах, а также локусов *MBP*, *CLEC18C* и Y-хромосомного региона в клетках бронхиального эпителия не были подтверждены методами COBRA и бисульфитным секвенированием. Авторы отмечают, что рассматриваемые изменения, вероятно, имеют место на уровне отдельных CpG-динуклеотидов анализируемого участка генома и/или затрагивают только малую фракцию клеточной популяции. Однозначно, в данной работе не показана индукция механизмов (например, инициация сигнальных каскадов), которые приводят к генерализованным изменениям ДНК-метилирования, представляющим собой ответ клетки на облучение [36].

Кроме того, широкогеномное изучение паттерна метилирования (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) не выявило значимых изменений изучаемых эпигенетических показателей в облученных фибробластах (X-лучи, 2 и 4 Гр) по сравнению с необлученными клетками, причем результат не зависел от области расположения CpG-сайта (промотор, 5'UTR, 3'UTR, экзоны, интроны, межгенные участки ДНК). Таким образом, показано, что, по крайней мере в ранней фазе (в пределах первого клеточного цикла после облучения), ответ нормальных клеток на облучение не ассоциирован с изменением паттерна метилирования [34].

В другом широкогеномном исследовании метилома (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) клеток

бронхиального эпителия человека показано, что воздействие на них такой радиации, как тяжелые ионы  $^{56}\text{Fe}$  (170 keV/ $\mu\text{m}$ , 0.1–1.0 Гр) и  $^{28}\text{Si}$  (70 keV/ $\mu\text{m}$ , 0.3–1.0 Гр), рентгеновское излучение (2 keV/ $\mu\text{m}$ , 1.0 Гр) приводит к индукции изменений метилирования генома, регистрируемых не только через 2 дня после воздействия, но и спустя 50 сут. Отмечено, что сайты, характеризующиеся дозозависимым изменением эпигенетического статуса, преимущественно гиперметируются при воздействии  $^{56}\text{Fe}$  и ассоциированы с открытым хроматином (энхансеры, промоторы, берега CpG-островков),  $^{28}\text{Si}$  в равной степени вызывает как гипер-, так и гипометилирование сайтов в более репрессированном хроматине, а X-лучи в большей степени приводят к гипометилированию, затрагивая транскрибируемую область гена и межгенные промежутки. Причем эффекты, индуцируемые при воздействии  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{28}\text{Si}$  и рентгеновских лучей наблюдались соответственно в сайтах, изначально характеризующихся низким, промежуточным и высоким уровнями метилирования. Отмечено, что спектр CpG-динуклеотидов, модифицированных в результате воздействия  $^{56}\text{Fe}$ , совпадает с таковым в клетках аденокарциномы и плоскоклеточного рака легких человека [37].

Частота гидроксиметилирования цитозинов, которое имело место преимущественно в облученных (X-лучи, 0.5 и 2 Гр) фибробластах легких (IMR90) по сравнению с необлученными клетками (метод иммунопреципитации + последующее секвенирование), возрастала с течением времени, прошедшего после облучения (от 1 до 120 ч), причем выраженность эффекта зависела от дозы облучения. Противоположная динамика отмечена для CpG-сайтов, расположенных в межгенных промежутках [38].

Таким образом, число исследований индуцированных облучением изменений метилирования нормальных (неопухолевых) клеток ограничено. Однако имеется гораздо большее количество экспериментальных работ, выполненных на опухолевых клетках, в том числе, посвященных изучению связи их радиочувствительности с эпигенетическим статусом, а также оценке эффективности воздействия ингибиторов метилирования ДНК в повышении чувствительности раковых клеток к облучению [39–41].

В широкогеномном исследовании (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) на раковых клетках молочной железы (линия MDA-MB-231), подвергшихся воздействию X-лучей в дозах 4 и 6 Гр и проанализированных через 1–72 ч после облучения, выявлены сотни дифференциально-метилованных генов, которые ассоциированы с клеточным циклом, ДНК репарацией, апоптозом. Измененный эпигенетический статус на протяжении всего эксперимента при облучении в дозах

2 и 6 Гр выявлен для 15 и 23 локусов соответственно. Выраженность рассматриваемых эпигенетических изменений зависела от дозы облучения и времени, прошедшем после воздействия радиации. Авторы отмечают, что в целом динамика метилирования согласуется с биологическим ответом клеток на повреждающее действие радиации и имеет не беспорядочный характер [42].

Другое широкогеномное исследование метилома (метил-ЦГ-иммунопреципитация + ДНК-микрочип методы) показало, что после фракционированного воздействия  $\gamma$ -излучения  $^{137}\text{Cs}$  в суммарной дозе 10 и 20 Гр (1–2 нед, 5 фракций в неделю по 2 Гр) на клетки рака молочной железы (линия MCF7), 15 генов характеризовались измененным эпигенетическим статусом (сравнение с необлученными клетками этой линии). Однако только для четырех генов (*ADAMTS9*, *FOXC1*, *TRAPPC9*, *AMIGO3*) дифференциальный статус метилирования CpG-островков верифицировался масс-спектрометрическим анализом. В целом уровень рассматриваемой модификации первых трех генов возрастал на 15–18% после облучения, а для *AMIGO3* локуса выявлено его снижение на 18%. Спустя 14 дней после воздействия, т.е. время, за которое происходило восстановление клоногенной активности клеток при дозе 10 Гр, но не 20 Гр, уровни метилирования генов *FOXC1* и *TRAPPC9* были значительно снижены по сравнению с таковыми, имевшими место сразу после экспонирования, но существенно превышали рассматриваемые показатели в необлученных клетках. По мнению авторов, возобновление роста клеток после фракционированного облучения в дозе 10 Гр ассоциировано с локус-специфическими изменениями ДНК-метилирования, связанными с апоптотическим сигналингом [35].

Показано, что воздействие радиации в дозе 5 Гр на клетки колоректальной карциномы линий HCT116 и SW620 приводит к ослаблению связывания DNMT1 с промоторами генов *Fas* и *4-1BBL*, снижая их метилирование. Аналогичный эффект наблюдался при обработке клеток 5-азациитидином (5-Aza). Таким образом, модулируется экспрессия этих генов, делая опухолевые клетки более чувствительными к иммунной атаке, опосредованной T-лимфоцитами [43].

Показана сопряженность радиочувствительности опухолевых клеток с уровнем метилирования тех или иных генов [44]. Например, показано, что радиочувствительность U87 клеток глиомы с низким уровнем экспрессии ATM – ключевого сигнального компонента клетки, индуцирующегося в ответ на повреждение ДНК, в 2 раза превышает аналогичный показатель в T98G клетках глиомы, экспрессирующих ATM белок в нормальном количестве. При этом отмечено, что причиной такой низкой индукции ATM в этих радиочувстви-

тельных клетках является метилирование промотора, а снятие этого метилирования приводит к увеличению уровня АТМ протеина в клетках и уменьшению их радиочувствительности [45]. Гиперметилирование других генов, например, гена *SOCS1* супрессора цитокинового сигналинга-1 в клетках глиобластомы или гена смерти-ассоциированной протеинкиназы *DAPK* в клетках рака шейки матки было ассоциировано с повышенной радиорезистентностью опухолей [46, 47].

Широкогеномное изучение паттерна метилирования (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) в клетках опухолей головы и шеи (HNSCC) показало, что по сравнению с радиочувствительными клетками линии SCC-61, радиорезистентные клетки rSCC-61 имеют сотни дифференциально метилированных сайтов, которые являются, в основном, гиперметилированными. Причем показано, что в радиорезистентных клетках гиперметилированных сайтов в 10 раз больше, чем гипометилированных. Повышенный уровень фермента DNMT3B, но не DNMT1 и DNMT3A, обнаружен также в радиорезистентных клетках. После объединения этих результатов с таковыми по экспрессии генов выявлено 84 дифференциально метилированных и экспрессируемых локусов в этих двух клеточных линиях (гены сигналинга, ассоциированного с интегрин-связанными киназами ILK, глюкокортикоидными рецепторами, гены, связанные с окислением жирных кислот и регуляцией клеточного цикла). Например, ген белка CCND2, участвующего в регуляции клеточного цикла, был репрессирован в rSCC-61 клетках (в отличие от клеток SCC-61), что ассоциировано с его гиперметилированием в промоторном регионе. Кроме того, данные по гиперметилированию генома рассматриваемой радиорезистентной линии опухолевых клеток были подтверждены результатами анализа эпигенетического статуса (Cancer Genome Atlas) клеток опухолей, резецированных у HNSCC пациентов [48].

В другой работе, посвященной изучению эпигенетического контроля радиочувствительности клеток немелкоклеточного рака легких (NSCLC), выявлен 1091 дифференциально-метилированный локус (гены, вовлеченные в клеточную адгезию и коммуникации, сигнальную трансдукцию, регуляцию транскрипции) при анализе (ДНК-микрочип, Illumina 27 K) двух клеточных линий: радиочувствительной H460 и радиорезистентной H1299. Показано, что число гиперметилированных генов ( $n = 747$ ) в H1299 клетках в 2 раза превышает таковой показатель в клетках H460 линии. Выявлено, что эпигенетический статус четырех генов, который существенно различался между клетками этих двух линий, что было подтверждено методом метил-специфической ПЦР, сопряжен с экспрессией локусов и чувствительностью клеток к радиационному воздействию.

Так, гипометилированные гены *SERPINB5* и *S100A6* (ингибиторы клеточной инвазии), активно экспрессирующиеся в радиочувствительной клеточной линии H460, были гиперметилированы и не транскрибировались в радиорезистентных H1299 клетках. При этом снижение экспрессии этих генов в экспериментах с малой интерферирующей РНК (siРНК, small interfering RNA) приводило к радиорезистентности, т.е. возрастанию выживаемости клеток H460 после  $\gamma$ -воздействия в дозах 5–8 Гр. Напротив, гены *CAT* (антиоксидантный фермент – каталаза) и *BNC1* (регулятор транскрипции) были гипометилированы в радиорезистентных клетках, а РНК-интерференция приводит к увеличению радиочувствительности [49].

При исследовании клеток плоскоклеточной карциномы гортани (бисульфитное пиросеквенирование) показано, что радиорезистентная линия RR-Нер-2 характеризуется повышенным (по сравнению с радиочувствительными клетками Нер-2) уровнем метилирования пяти генов (*TOPO2A*, *PLXDC2*, *ETNK2*, *GF11* и *IL12B*), которые были предварительно идентифицированы как сопряженные с данным фенотипом по базе маркерных экспрессирующихся последовательностей (EST, expressed sequence tag). Уровень ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B были также выше в RR-Нер-2 клетках по сравнению с таковыми в Нер-2 клетках [50].

Показано, что общий уровень метилирования ДНК (radiolabeled [3H] dCTP extension assay) в доксорубин-резистентных клетках аденокарциномы молочной железы (линия MCF-7/DOX) существенно ниже, чем таковой в клетках MCF-7, чувствительных к этому цитостатику. Различный эпигенетический статус клеток этих линий был сопряжен с дифференциальной клеточной чувствительностью к воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Так, облучение не приводило к индукции апоптоза клеток MCF-7/DOX, и, напротив, MCF-7 клетки были чувствительны к радиационно-индуцированному апоптозу. Значительное увеличение уровня метилирования в клетках (обе линии) являлось результатом их обработки (в течение 6 дней) S-аденозилметионином (SAM), являющимся донором метильных групп. Последующее облучение не приводило к изменению количества метилированных цитозинон в клетках, но при этом отмечены существенное возрастание радиочувствительности MCF-7/DOX клеток и ее снижение в изначально радиочувствительной MCF-7 линии. Авторы предполагают, что последнее связано с метилированием и последующим репрессированием некоторых апоптотических генов [51].

Показано, что резистентность к цитостатикам ассоциирована с повышенным уровнем детокси-

фикации свободных радикалов системой глутатиона, которая использует SAM как источник метильных групп для глутатион-S-трансфераз. Это приводит к истощению SAM в клетках, вызывая гипометилирование. Кроме того, известно, что “отдав” метильную группу, SAM превращается в SAH (S-аденозил-гомоцистеин), который обладает ингибирующим действием на активность ДНК-метилтрансфераз [52, 53].

Следует отметить, что гиперметилирование некоторых генов сопряжено не только с чувствительностью опухолевых клеток к облучению *in vitro*, но и имеет прогностическую значимость при радио-/химиотерапии опухолей. Например, гиперметилирование гена *MGMT* в клетках резецированной глиобластомы сопряжено с эффективностью последующей радиотерапии и выживаемостью пациентов [54]. Эта эпигенетическая модификация ассоциирована с высокой чувствительностью рассматриваемой опухоли к алкилирующему агенту кармустину, что ассоциировано с ее регрессией и длительной ремиссией болезни [55]. Аналогичный результат получен и в другом исследовании при анализе последствий лечения глиобластомы облучением в сочетании с темозоломидом с последующим адьювантным курсом этого препарата [56]. И напротив, гипометилирование *LINE-1* в клетках злокачественных опухолей ассоциировано, в большинстве случаев, с плохим прогнозом заболевания, неэффективностью радио- и химиотерапии, низкими показателями выживаемости пациентов [57].

В экспериментальных исследованиях *in vitro* показано, что воздействие (в течение 18–48 ч перед облучением) таких ингибиторов метилирования ДНК как зебуларин, псаммаплин, 5-аза-2'-дезоксидцитидин (5-aza-dC) на раковые клетки различных линий (панкреатическая карцинома, MiaPaCa; глиобластома, U251; карцинома простаты, DU145; глиобластома, U373MG; карцинома легких, A549; карцинома головы и шеи, HNSCC) приводит к возрастанию их радиочувствительности за счет накопления нерепарированных повреждений ДНК [58–60]. Наблюдаемый эффект подобен действию ингибиторов гистоновых деацетилаз (MS-275, вальпроевая кислота, LBH589, битулат), который наблюдался в экспериментах по оценке чувствительности к облучению *in vitro* опухолевых клеток различных линий и нормальных лимфоцитов человека при их предварительной обработке этими соединениями, приводящей к гиперацетилованию гистонов и релаксации хроматина [61–64].

В другой работе продемонстрировано, что вызванное 5-aza-dC повышение радиочувствительности клеток рака желудка (OCUM-2M, OCUM-12, MKN-45 линии) связано с G2-M арестом, а также апоптотической гибелью клеток, что сопровож-

далось повышенной экспрессией *p53*, *RASSF1* и *DAPK* семейства генов. Отсутствие рассматриваемого эффекта для клеток линий KATO-III и MKN-74 было ассоциировано с наличием мутации гена *p53* [65]. Показано, что псаммаплин А оказывает цитотаксическое действие на клетки карциномы эндометрия через селективную индукцию апоптоз-связанных генов [66]. Продемонстрировано, что 5-aza-dC может индуцировать G2-M арест и апоптоз в клетках остеосаркомы некоторых линий (SaOS2, HOS и U2OS) *p53*-независимым способом [67], что наблюдалось и в другом исследовании с децитабином [68]. Показано, что предобработка клеток назофарингеальной карциномы линий CNE2 и SUNE1 5-Aza за 24 ч до облучения (X-лучи, 2 Гр) приводит к существенному возрастанию их радиочувствительности за счет повышения уровня апоптотической гибели клеток, но не влияет на течение клеточного цикла и репарацию двунитевых разрывов ДНК [69].

В то же время предобработка радиорезистентных клеток карциномы головы и шеи rSCC-61 5-Aza не приводила к повышению радиационно-индуцированной клеточной гибели и количеству поврежденных ДНК (фосфорилированные  $\gamma$ -H2AX фокусы). Ранее эти же авторы показали повышенную пролиферативную активность rSCC-61 клеток по сравнению с SCC-61 клетками и G2/M – арест SCC-61 клеток в ответ на радиационное воздействие [70, 71].

Таким образом, наличие эффекта повышения радиочувствительности опухолевых клеток в эксперименте *in vitro* путем предварительной их обработки ингибиторами ДНК-метилтрансфераз, а также механизм реализации этого феномена зависят от типа клеток, использованного деметилирующего соединения, его концентрации, схемы эксперимента [69]. Хотя установлено, что, как правило, радиорезистентный фенотип опухолевых клеток ассоциирован с гиперметилированием промоторов множества генов (клеточного цикла и апоптоза, ингибиторов клеточной инвазии и др.), механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование, чтобы увеличить повреждаемость опухолевых клеток, приводящую их к гибели.

*Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК в потомках облученных клеток.* Имеются работы, свидетельствующие об изменении профиля метилирования в отдаленных потомках облученных клеток. Так, воздействие X-лучей (2 Гр) и ионов  $^{56}\text{Fe}$  (1 Гр) на гибридные GM10115 клетки приводило к индукции гипометилирования *LINE-1* и *Alu* повторов (метод COBRA, Combined Bisulfite Restriction Analysis) в их отдаленных потомках (16–20-клеточная генерация). Что касается более низких доз облучения (X-лучи 0.5 Гр и  $^{56}\text{Fe}$  0.1 Гр), только воздействие рентгеновского

излучения в дозе 0.5 Гр приводило к значимому эффекту гиперметилирования. Существенное увеличение тотального уровня 5-метилцитозина (метод MSAP, methylation sensitive amplified polymorphisms) выявлено только для X-лучей в дозе 0.5 Гр, а его уменьшение — для  $^{56}\text{Fe}$  (1 Гр). При всех вариантах эксперимента не выявлено изменений в метилировании промоторов изученных генов (*NFkB*, *TSLC1*, *CDH1*) (метод метилспецифической ПЦР, бисульфитное пиросеквенирование) [72, 73]. В целом с этими данными согласуются результаты, полученные в других исследованиях с использованием других клеточных линий. Так, показана индукция гипометилирования *LINE-1* в отдаленных потомках клеток колоректальной карциномы человека RKO, подвергшихся воздействию X-лучей в дозе 1 Гр. Однако такое же воздействие приводило к гиперметилированию этих элементов генома в первичных диплоидных фибробластах кожи человека AGO1522D. Рассматриваемых эпигенетических изменений *Alu* повторов не выявлено. Однако воздействие протонов и ионов  $^{56}\text{Fe}$  приводило к гипометилированию *LINE-1* и *Alu* в обеих клеточных линиях. Для последних показано тотальное гиперметилирование при действии протонов и ионов, и гипометилирование при действии X-лучей [74]. Таким образом, показана зависимость рассматриваемых эпигенетических эффектов от типа радиации, ЛПЭ излучения, типа клеток, тканей, времени, прошедшем после облучения.

Показаны дисрегуляции в метилировании ДНК в потомках 20-й клеточной генерации HPV-G кератиноцитов человека, подвергшихся воздействию  $\gamma$ -излучения в дозах 0.1–1.0 Гр. Аналогичные нарушения выявлены в потомках клеток, обработанных средой от облученных клеток (5 Гр) и проявляющих “эффект свидетеля”. В основном преобладало гиперметилирование, в том числе в последовательностях ретротранспозона и сателлитной ДНК (*MLT1A* и *SAT2*). Эти эпигенетические нарушения сопровождались проявлениями нестабильности генома: повышенные частоты аберрации хромосом, апоптотическая и репродуктивная гибель клеток [75].

Как известно, метилирование ДНК является необходимым условием нормального роста и функционирования соматических клеток, а эмбриональные стволовые (ЭС) клетки являются удобной моделью для изучения роли этого эпигенетического процесса в механизмах таких эффектов радиации как геномная нестабильность и эффект свидетеля. DNMT1(–/–) или DNMT3A(–/–)DNMT3B(–/–) ЭС клетки, накаутированные по генам метилтрансфераз, не изменяли способность пролиферировать, сохранять постоянный набор хромосом, перицентромерные гетерохроматиновые до-

мены (метилирование лизина 9 гистона H3) и свойства недифференцированных клеток [76].

Проведена серия экспериментов, доказывающая роль метилирования ДНК и метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A (но не DNMT3B) в сохранении “памяти” в потомках облученных ЭС клеток о перенесенном воздействии  $\gamma$ -излучения ( $^{60}\text{Co}$ , 3 Гр, 73 сГр/мин) и в индукции нестабильности генома в клетках-соседях, культивированных в одной среде с этими клетками. Так, не выявлено отличий в частотах сестринских хроматидных обменов (СХО) в клетках, культивированных совместно с потомками облученных и необлученных “накаутированных” DNMT1–/– (или DNMT3A–/–) ЭС клеток. При этом отмечено, что в отличие от необлученных нормальных ЭС клеток (WT-клетки), клетки DNMT1–/– и DNMT3A–/– индуцировали СХО в их WT-клетках соседях, что указывает на нестабильный фенотип клеток с “накаут” генами метилтрансфераз и свидетельствует об определенном пороге, выше которого не происходит индукции нестабильности генома под действием радиации. Эксперименты с добавлением доксициклина, вызывающего временную супрессию гена *DNMT1*, подтверждают роль метилтрансфераз-опосредованных механизмов в сохранении и передаче сигнала о нестабильности генома клеткам, соседствующим в культуре с потомками облученных клеток [77].

Экспериментальные исследования ЭС клеток, характеризующихся различным уровнем метилирования ДНК (результат наличия или отсутствия ДНК-метилтрансфераз), показали, что их радиочувствительность (радиационно-индуцированная отсроченная геномная нестабильность) не определяется только сниженным уровнем метилирования генома, а зависит от присутствия в клетке в активном состоянии определенных ДНК-метилтрансфераз. Так, отсутствие DNMT1 (но не DNMT3A и DNMT3B) приводило к 10-кратному увеличению *de novo* *HPRT* мутаций, но этот уровень не изменялся при воздействии радиации; напротив, в ЭС клетках дикого типа радиационно-индуцированная нестабильность генома в отдаленных потомках облученных клеток имела место. Такая парадоксальность результатов, по видимому, объясняется тем, что требуется специфический паттерн метилирования и/или присутствия метилтрансфераз, чтобы рассматриваемый феномен имел место. Предполагается, что изменения в активности DNMTs или паттерне метилирования ДНК потенциально может изменять секреторный профиль клетки (такие факторы как TNF $\alpha$ , NO и TGF $\beta$ ), что влияет на стабильность генома [78]. Эта проблема является очень важной, так как лежит в основе механизмов радиорезистентности особой популяции опухолевых клеток, имеющих характеристики, аналогичные таковым стволовых клеток (потенциал к самообновлению, спо-

способность формировать опухоли, генетический и эпигенетический код) [79, 80].

#### *Экспериментальные исследования in vivo*

*Изменения тотального уровня метилирования ДНК.* Эксперименты, проведенные на клетках тимуса и ККМ аутобредных мышей Wister свидетельствуют о динамическом характере гипо-/гиперметилирования синтезируемой ДНК в течение первых 9 дней после облучения животных, и относятся к концу 70-х годов прошлого века [81]. Позже было выявлено снижение уровня 5-метилцитозина (метод HPLC) в печени мышей C57BL/6NJcI через 8 ч после воздействия (X-лучи, 4–7 Гр), а не сразу после экспозиции. Эффект гипометилирования сохранялся в течение всего эксперимента (8–72 ч) и не зависел от дозы. Аналогичные эффекты в клетках мозга и селезенки отсутствовали [29].

Показано, что облучение мышей СВА/Н (X-лучи, 3 Гр) приводило к снижению тотального уровня 5-метилцитозина (на 8%, HPLC-метод) в клетках ККМ животных, но не селезенки, через 4–14 дней после воздействия. Причем рассматриваемый эффект не наблюдался у мышей линии C57BL/6, являющихся резистентными к радиационно-индуцированной индукции острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и хромосомной нестабильности. При этом степень гибели клеток в гипометилированном костном мозге (больше 80%) превышает таковую в селезенке (50%) и не различается у животных с рассматриваемыми генотипами. Полученные данные свидетельствуют о связи гипометилирования с повышенной радиочувствительностью генома клеток. Учитывая то, что у животных обеих линий общая радиочувствительность и кинетика восстановления ККМ одинаковы, различия в индукции эпигенетических модификаций в зависимости от генотипа особи не могут объясняться исключительно особенностями пролиферативной активности клеток [82].

У потомков облученных мышей-самцов C57BL/6 и обоих облученных родителей (острое воздействие, X-лучи, 2.5 Гр), наряду с повышенной частотой разрывов ДНК в тимусе, наблюдались существенные отклонения в эпигенетической регуляции: снижение глобального метилирования, сопровождающееся пониженной экспрессией ДНК-метилтрансфераз DNMT1 (восстановление метилирования в дочерней нити ДНК после репликации), DNMT3A и DNMT3B (метилирование *de novo*), а также метил-СрG-связывающего белка MeCP2 – фактора, регулирующего экспрессию генов и ремоделирование хроматина [83]. Аналогичные изменения выявлены в тимусе мышей, подвергшихся фракционированному воздействию X-лучей в дозе 0.5 Гр [84].

В клетках молочной железы крыс после острого воздействия X-лучей в дозе 5 Гр также наблюдались существенные изменения эпигенетического статуса (глобальное гипометилирование, сопровождающееся снижением экспрессии ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A, DNMT3B и белка MeCP2) наряду с повышением уровня белков внутриклеточных сигнальных систем (фосфорилированные киназы p-ERK1/2 и p-AKT), белков репарации (RAD51, KU70, POLB-фермент) и контроля клеточного цикла (циклины D1, D3 и PCNA). Через 6 ч после облучения отмечался повышенный уровень апоптоза, что сопровождалось незначительным повышением клеточной пролиферации [85]. Авторы рассматривают полученные данные в контексте связи этих изменений с механизмами канцерогенеза. Следует отметить, что аналогичные эпигенетические нарушения выявлены и в раковых клетках молочной железы человека [86].

Острое и фракционированное воздействие радиации (50 сГр за 10 дней, т.е. 5 сГр за день, 0.2 сГр/с) на мышей линии C57/B16 приводило к значительному снижению метилирования ДНК в клетках селезенки и печени у самок. Напротив, у самцов выявлено глобальное гиперметилирование ДНК клеток селезенки и отсутствие каких-либо эпигенетических изменений в клетках печени. Выявленное глобальное гипо- и гиперметилирование было сопряжено соответственно со сниженной и повышенной экспрессией ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B. Изменение активности DNMT1 наблюдалось только у самок в клетках печени после хронического облучения. Выявлена роль половых гормонов, в частности эстрогенов, в индукции изменений в метилировании ДНК [87]. Тканеспецифичный и зависящий от пола облученной особи характер изменений метилирования ДНК отмечен и в других публикациях этих авторов [88, 89]. При этом показано, что хроническое облучение в высоких дозах (5 Гр) не приводит к изменению паттерна метилирования ДНК [89].

Выявлено существенное снижение уровня глобального метилирования (метод HPLC) в клетках крови мышей BALB/c через 2 ч после их фракционированного облучения (0.5 Гр, 10 дней, X-лучи) и отсутствие эффекта спустя 1 мес. после радиационного воздействия [90].

Показано, что через 22 нед после перенесенного мышами C57BL/6 воздействия ионов  $^{56}\text{Fe}$  в дозе 40 сГр уровень тотального метилирования ДНК (метод ELISA) в клетках легкого существенно превышал аналогичный показатель в контроле. При этом значимый эффект отсутствовал при облучении в дозе 10 и 20 сГр [91].

В отдаленные периоды (1 нед, 1 мес.) после воздействия на мышей СВА/СaJ ионов  $^{48}\text{Ti}$  (0.1–

0.5 Гр, 0.01 Гр/мин, 1 GeV/n) выявлено зависимое от дозы увеличение общего уровня метилированных цитозинов (ELISA метод) в клетках печени животных. Через 6 мес. после радиационного воздействия значимое повышение рассматриваемого эпигенетического показателя наблюдалось только при облучении в дозе 0.5 Гр. Напротив, уровень 5-гидроксиметилцитозина был снижен во всех вариантах эксперимента и зависел от дозы облучения. Выявленные изменения паттерна метилирования сопровождались выраженным хроническим оксидативным стрессом (повышение уровня малонового диальдегида) и воспалительным ответом (возрастание уровней активированного NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) [92].

Выявлен разнонаправленный характер изменений общего уровня метилирования ДНК (метод ELISA) в гонадах самок и самцов крыс Sprague-dawley, получавших от рождения до 9-месячного возраста питьевую воду, содержащую природный уран UO<sub>2</sub> (40 мг/л): гипометилирование ДНК клеток яичников (на 18% меньше, чем в контроле) и гиперметилирование ДНК (на 17% больше) клеток семенников. Аналогичные изменения, но в большей степени, наблюдались в этих же тканях в F1 и F2 поколениях животных, что указывает на трансгенерационный характер эпигенетических нарушений. Выявлены также изменения в экспрессии ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), что не всегда коррелировало с уровнем метилирования ДНК и указывает, по мнению авторов, на посттранскрипционные эффекты регуляции активности энзимов [93].

В костномозговых гемопоэтических клетках (стволовых и клетках-предшественниках, HPCs) мышей C57BL/6J выявлен разнонаправленный характер изменений паттерна метилирования в ближайшие (4 нед) и отдаленные (22 нед) сроки после воздействия на животных <sup>56</sup>Fe (0.1, 0.2 и 0.4 Гр). Так, эпигенетический статус этих клеток после облучения характеризовался отчетливой тенденцией к повышенному тотальному уровню 5-метилцитозина (иммунофлуоресцентный метод). По прошествии 22 нед наблюдалось дозозависимое уменьшение тотального уровня метилирования генома, значимое при дозе 0.4 Гр [94].

*Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК.* Не выявлено изменений уровней метилирования повторов (методы высокочувствительного плавления и пиросеквенирования) *LINE-1*, *SINE B1* и *IAP* в клетках периферической крови мышей C57BL/6 спустя 85–420 дней после воздействия на них X-лучей в дозе 10 мГр по сравнению с таковыми показателями, зарегистрированными за 3 дня до облучения животных. Аналогичные результаты получены для клеток селезенки и печени спустя 420 дней после воздействия радиации, хотя, как известно, клетки этих орга-

нов обладают высокой радиочувствительностью и выраженными возрастными изменениями соответственно [95].

В то же время облучение мышей радиочувствительных (BALB/c и CBA) и радиорезистентной (C57BL/6) линий в дозе 1 Гр (X-лучи) приводило к изменениям метилирования, зависящих от генотипа организма, пола, исследованной ткани, времени после облучения и типа изученного повтора (*LINE-1*, *SINE B1* и *IAP*). Наиболее выраженный ответ наблюдался у самцов BALB/c и CBA. Показано, что животные всех линий проявляли ранний ответ на облучение (через 1 день после воздействия), характеризующийся возрастанием уровня метилирования *LINE-1* элемента. Причем у мышей BALB/c эти эпигенетические изменения сохранялись и через 6 дней после воздействия, а у радиорезистентных животных C57BL/6 наблюдалась потеря метилирования через 14 дней после экспозиции [96].

Не выявлены изменения метилирования *LINE 1* повторов (*TF* и *A1* мономеры, бисульфитное пиросеквенирование) в легких и печени мышей C3H/HeN через 1–120 сут после воздействия на них <sup>56</sup>Fe в дозах 10, 30 и 100 сГр по сравнению с таковыми показателями у необлученных животных [96]. В то же время в уже упомянутой работе [91] уровень метилирования *LINE1* повтора (метилчувствительная MsrBC-qPCR) в клетках легкого у мышей через 22 нед после перенесенного животными воздействия ионов <sup>56</sup>Fe в дозе 40 сГр существенно превышал аналогичный показатель в контроле. При этом значимый эффект отсутствовал при облучении в дозе 10 и 20 сГр. Заслуживает внимания факт, что при этом наблюдалась существенная потеря экспрессии *LINE 1* и *SINE1* транспозонов, а также других повторов (Charlie, минорные сателлиты), проявивших тенденцию к гиперметилированию.

Через 2 мес. после воздействия  $\gamma$ -радиации в дозах 0.1 и 1 Гр на мышей C57BL/6J и CBA/J наиболее выраженный эффект индукции гипометилирования 5'-нетранслируемых регионов (5'-UTRs) *LINE-1* элементов наблюдался в гемопоэтических стволовых клетках (HSCs) у радиочувствительных CBA/J животных, склонных к канцерогенезу системы кроветворения. Эффект был более выражен при облучении в большей дозе. В предшественниках зрелых клеток крови (HPCs) наблюдались разнонаправленные эффекты при воздействии излучения в дозе 0.1 и 1 Гр: гиперметилирование и гипометилирование соответственно. В мононуклеарных клетках (MNCs) у этих же мышей выявлено радиационно-индуцированное гиперметилирование с наиболее выраженным эффектом при воздействии в дозе 1 Гр. Таким образом, направленность и выраженность радиационно-индуцированных изменений метилирования 5'-UTRs

*LINE-1* элементов зависела от генотипа особи, вида анализируемых клеток, дозы облучения [97].

Выявлена индукция гипометилирования *LINE-1* ORF1 (кодирует шаперон ORF1p) в клетках сердца мышей C57BL/6J через неделю после воздействия на животных излучений с высокой ЛПЭ: протонов (0.1 Гр, 150 MeV,  $0.53 \pm 0.08$  Гр/мин), тяжелых ионов  $^{56}\text{Fe}$  (0.5 Гр, 600 MeV,  $0.38 \pm 0.06$  Гр/мин). Радиационно-индуцированные изменения метилирования других исследованных повторов (*ERV1*, *ERV2*, *SINE B1*, *SINE B1*, транспозоны *Charlie* and *Mariner*, центромер-ассоциированная сателлитная ДНК) не наблюдались. В то же время на 90-й день после облучения выявлено гиперметилирование нескольких изученных повторяющихся последовательностей ДНК, индуцированное в результате воздействия этих плотноионизирующих излучений: *LINE-1* ORF1, *ERV2*, а для *SINE B1* и основных сателлитов этот эффект наблюдался только при воздействии тяжелых ионов  $^{56}\text{Fe}$ , но не протонов [98].

В костномозговых гемопоэтических клетках (стволовых и клетках-предшественниках, HPSCs) мышей C57BL/6J выявлен разнонаправленный характер изменений паттерна метилирования *LINE1* и *SINE B1* повторов (метилчувствительная Real-time PCR) в ближайшие (4 нед) и отдаленные (22 нед) сроки после воздействия на животных  $^{56}\text{Fe}$  (0.1, 0.2 и 0.4 Гр): статистически значимая зависимость от дозы индукция гиперметилирования и тенденция к их гипометилированию соответственно. В то же время в более дифференцированных мононуклеарных клетках (MNCs) через 4 нед после облучения наблюдалось зависящее от дозы гипометилирование *LINE1* и *SINE B1* (при облучении в дозе 0.4 Гр изменения были статистически значимые) [94]. Полученные результаты демонстрируют разный ответ клеток гемопоэтической системы на облучение, что связано со степенью их дифференцировки, сопряженной с разным эпигенетическим статусом. Показано, что менее дифференцированные HPSCs клетки имеют более высокие уровни тотального метилирования генома (на 19% выше), метилирования *LINE1* и *SINE B1* повторов (в 5–10 раз выше) и экспрессии ДНК-метилтрансфераз (в 2.0–4.6 раза выше) по сравнению с дифференцированными MNCs клетками. Эти результаты согласуются с выводами, сделанными другими исследователями [99], в том числе о том, что ответ клеток организма на метил-дефицитную диету будет определяться паттерном метилирования [100].

Выявлена (бисульфитное пиросеквенирование) существенная индукция гипометилирования *LINE-1* ORF1 в ткани легкого после воздействия протонов и последовательного действия протонов (1-й день) +  $^{56}\text{Fe}$  (2-й день). В этой же работе показано, что воздействие протонов

(0.1 Гр, 150 MeV/n),  $^{56}\text{Fe}$  (0.5 Гр, 600 MeV/n) или протонов (1-й день) +  $^{56}\text{Fe}$  (2-й день) приводило преимущественно к гиперметилированию 5'-UTRs области *LINE-1*, имеющих больший эволюционный возраст, а паттерн метилирования “более молодых” повторов оставался неизменным спустя 4 нед после облучения [101]. Следует отметить, что показана обратная связь между уровнем метилирования и эволюционным возрастом *LINE-1*. При этом в эксперименте *in vitro* с RAW264 мышиными макрофагами воздействие деметилирующего агента 5-aza-dC приводило к значимому снижению метилирования “более молодых” повторов, способных к реактивации и ретранспозиции. Кроме того, эксперименты *in vivo* с мышами, находящимися на метионин-дефицитной диете, свидетельствуют о существенной потере метилирования в пределах 5'-UTRs области только двух А-типов *LINE-1*: *LIMda\_I* (0.21 Myr) и *LIMda\_VI* (4.7 Myr) [101].

*Локус-специфические изменения метилирования ДНК.* Показана реальность индукции гиперметилирования генов при воздействии на животных как ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ ( $^{56}\text{Fe}$ , 10–100 сГр), так и низкой ЛПЭ (Х-лучи, 50 сГр). Так, показано радиационно-индуцированное гиперметилирование 811 регионов генома (иммунопреципитация+ДНК-микрочип: MeDIP-on-chip), определяющих все основные биологические процессы, в клетках крови мышей BALB/c через 2 ч после перенесенного хронического радиационного воздействия (0.5 Гр, 10 дней, Х-лучи). Для двух генов репарации и клеточного цикла (*Rad23b* и *Ddit3*) проведено изучение (бисульфитное секвенирование) и выявлено сохранение aberrантного эпигенетического маркирования через 1 мес. после облучения, что сопряжено со сниженной экспрессией этих генов [90].

Выявлены изменения метилирования промоторов генов (бисульфитное пиросеквенирование) в легких, но не в печени, у мышей C3H/HeN, подвергшихся воздействию  $^{56}\text{Fe}$  в дозах 10, 30 и 100 сГр. Показана зависимость наблюдаемых эффектов от дозы облучения, причем в целом воздействие в более низких дозах ассоциировалось с наибольшими эффектами. Так, в ближайшие сроки после облучения (1-й день) выраженное гиперметилирование наблюдалось для всех изученных генов (*DAPK1*, *EVL*, *14.3.3*, *p16*, *MGMT*, *IGFBP3*) только при воздействии в дозе 10 сГр. Выраженность и направленность отдаленных эпигенетических эффектов определялись временем, прошедшим после облучения, дозой радиации, анализируемым локусом и имели циклический характер. Так, на 7-й день после радиационного воздействия наблюдалось существенное гипометилирование *DAPK1* и *14.3.3* при облучении только в дозе 10 сГр, а для других генов ана-

логичный эффект наблюдался при всех дозах. Через 30 и 120 дней после облучения для пяти изученных генов (*DAPK1*, *EVL*, *14.3.3*, *p16*, *MGMT*) отмечалась разнонаправленность в изменении метилирования при облучении в дозах 10 и 30 сГр: гиперметилирование через 30 дней после воздействия и гипометилирование через 4 мес. после облучения. Эти эффекты не наблюдались при воздействии в дозе 100 сГр [96].

Результаты изучения локус-специфических изменений метилирования (Mouse Lung Cancer DNA Methylation PCR Array) в клетках легкого мышей через 22 нед после перенесенного животного воздействия ионов  $^{56}\text{Fe}$  в дозе 10–40 сГр свидетельствуют о наличии значимых эффектов облучения преимущественно при самой низкой дозе – 10 сГр: пять (*Cadm1*, *Cdh13*, *Cdkn1c*, *Mthfr* and *Sfrp1*) из 22 исследованных генов, потенциально ассоциированных с развитием рака легкого, были гиперметилированы, при том, что воздействие в более высоких дозах приводило к абберрантному метилированию только одного гена – *Cdkn1c* [91].

Выявлены устойчивые изменения уровней (иммунопреципитация + секвенирование: MeDIP-Seq) метилирования и гидроксиметилирования CpG-сайтов в клетках левого желудочка сердца, а также гиппокампа через 5 мес. после воздействия на мышей протонов (1 Гр, 150 MeV). Выявленный спектр CpG-динуклеотидов, характеризующихся эпигенетическим ремоделированием, индуцированным в результате облучения, имел тканеспецифичный характер и затрагивал гены, ответственные за развитие и дифференцировку клеток сердца и сосудов (*SRF*, *Nkx2-5*, *Miocardin* и др.), а также рост аксонов, дифференцировку нейронов, нейрогенез, синаптическую передачу, G-протеиновый сигналинг [102]. В другом исследовании этих же авторов выявлены изменения уровней метилирования и гидроксиметилирования CpG-сайтов генома в клетках гиппокампа мышей, подвергшихся воздействию  $^{56}\text{Fe}$  (600 MeV) в дозах 0.1 и 0.4 Гр (но не 0.2 Гр), регистрируемые через 2 нед после облучения, что коррелировало с когнитивными изменениями. При этом сохранность эпигенетического ремоделирования генома по прошествии 20 нед после воздействия отмечалась только в отношении уровней 5-гидроксиметилцитозина и коррелировала с экспрессией генов [103, 104].

Показано выраженное аномальное метилирование промотора гена опухолевого супрессора *p16/INKa* при хроническом низкодозовом воздействии (50 сГр за 10 дней, 0.2 сГр/с, X-лучи). Отмечены тканеспецифичные и зависящие от пола различия в метилировании. У самцов облученных мышей метилирование промотора гена *p16/INKa* в клетках печени было более выражено,

чем у самок. Напротив, для клеток мышечной ткани не выявлено различий по этому показателю у особей разного пола. Не выявлено существенных изменений после радиационного воздействия в метилировании промотора гена *MGMT*. Авторы также заключают, что хроническое воздействие радиации в малых дозах является более сильным индуктором эпигенетических эффектов, а значит и дестабилизации генома, чем острое облучение в той же дозе [88].

У мышей BALB/c уровень метилирования восьми из 23 проанализированных сайтов CpG-островка гена *p16* (бисульфитное секвенирование) был существенно выше в радиационно-индуцированных тимических лимфомах, индуцированных облучением в дозе 1.75 Гр (4-MV линейный ускоритель), чем в необлученных образцах тимуса, что сопровождалось транскрипционной инактивацией этого гена [105].

Показано, что внутриутробное облучение (MicroCT scanner) мышей-самцов  $A^y$  агути (но не самок) приводило к гиперметилированию *IAP* промотора (часть инсерции *IAP* элемента в псевдоэкзон PS1A, расположенном перед промотором дикого типа) в клетках хвоста и печени при воздействии в дозах 0.7–3 сГр, но не 0.4 и 7.6 сГр, что коррелировало с окраской шерсти – псевдоагути, характерной для животных, имеющих пониженный риск развития ожирения, рака, инсулиновой резистентности. Таким образом, в данном случае радиационное воздействие приводило к положительному адаптивному эффекту, индукция которого зависела от дозы и пола особи [106].

Гиперметилирование промоторов генов *p16/INK4A* и *RASSF1*, повышенная активность ДНК-метилтрансфераз и модификации гистонов наблюдались также в клетках кожи мышей, подвергшихся воздействию УФ-В, а также в опухолях кожи, индуцированных этим излучением [107].

Выявлены нарушения импринтинга гена *H19* в сперме мышей, подвергшихся хроническому воздействию рентгеновского излучения (1.3 Гр) на постмейотической стадии сперматогенеза, и аналогичные изменения паттерна метилирования контрольного региона импринтинга в печени потомков [108].

В целом отмечены тканеспецифичные, зависящие от пола, анализируемого локуса, дозы и мощности дозы, типа воздействующей радиации, времени, прошедшем после облучения, различия в выраженности индуцированного абберрантного эпигенетического маркирования.

*Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК как проявления “эффекта свидетеля”.* Имеются данные, свидетельствующие о сопряженности эпигенетических нарушений с индукцией “эффекта свидетеля” на уровне организма *in vivo*. Так, показано, что после локального воз-

действия рентгеновского излучения на область черепа крыс в дозе 20 Гр (терапевтическая доза при лечении опухолей головного мозга) индуцируется “эффект свидетеля” в необлученной селезенке (свинцовая защита) этих же животных, сопряженный с существенной дисрегуляцией эпигенетических механизмов, о чем свидетельствуют изменения ряда показателей, выявляемые даже через 7 мес. после облучения: глобальное ДНК гипометилирование, изменения в метилировании *LINE-1* повторов и области ретротранспозонов, снижение экспрессии ДНК-метилтрансфераз и метил-СрG-связывающего протеина MeCP2. Кроме того, выявлены значительные изменения в экспрессии *miR-194*, мишенью которых являются как ДНК-метилтрансфераза DNMT3A, так и MeCP2. Этими же авторами показана значимость пола особи в индукции “байстендер эффектов” (повреждения ДНК, изменения клеточной пролиферации и апоптоза, глобального метилирования ДНК) в необлученной селезенке у мышей, подвергшихся радиационному воздействию на область головы [109, 110].

Проведено моделирование “эффекта свидетеля” на лабораторных животных (мыши C57BL/6), которые подверглись острому (0, 5 Гр) или фракционированному (0, 1 Гр/день, 5 дней) воздействию рентгеновских лучей, при этом рассматривались два варианта эксперимента: облучение всего тела и локальное облучение черепа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как фракционированное, так и острое облучение вызывают “эффект свидетеля” в необлученных селезенке и коже, однако его эпигенетические проявления (гипометилирование ДНК, снижение экспрессии метил-СрG-связывающего протеина MeCP2, изменение спектра микроРНК) в коже и селезенке были различными. Так, только в селезенке они наблюдались даже через 14 дней после облучения [111].

Показано, что хотя через 4 дня после облучения у мышей только одной половины тела (Х-лучи, 1 Гр, 2 сГр/с) в клетках облученной и необлученной кожи (свинцовая защита) уровень разрывов ДНК достиг контрольного уровня, в “байстендер” клетках сохраняются изменения, характеризующиеся дисрегуляторными процессами в метилировании ДНК, а именно сверхэкспрессирована ДНК-метилтрансфераза DNMT1, а уровни метил-СрG-связывающих протеинов MeCP2 и MBD2 значительно повышены, что не отмечено для облученных клеток [112].

В целом эпигенетические изменения, характерные для “эффекта свидетеля”, зависят от анализируемого органа, мощности дозы, области тела, подвергшейся облучению. Эта проблема является крайне важной и должна учитываться при разработке стратегии и тактики радиотерапии

злокачественных опухолей и последующих лечебно-диагностических мероприятий с целью минимизации риска развития побочных эффектов в здоровых тканях организма.

## РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У ЧЕЛОВЕКА

*Изменения тотального уровня метилирования ДНК.* Имеется лишь одна работа, результаты которой свидетельствуют о тотальном гипометилировании генома у рабочих атомной индустрии (анализ с применением антител к 5-метилцитозину), подвергшихся комбинированному воздействию излучений с высокой и низкой ЛПЭ. При этом выявлена обратная корреляционная связь между уровнем метилированных цитозинов и частотой aberrаций хромосомного типа в группе облученных лиц, а также дозой облучения, накопленной ими за последние 1.5 года, предшествовавших взятию образцов крови. Кроме того, отмечено, что у рабочих с суммарной накопленной дозой больше 103.14 мЗв уровень метилирования генома был существенно выше такового при более низких уровнях облучения (менее 103.14 мЗв), что указывает на дифференциальный характер ответа эпигенома на воздействие в низких и высоких дозах. По мнению авторов, возрастание рассматриваемого эпигенетического показателя при увеличении дозы облучения имеет защитный механизм [113]. В последующей работе этого же коллектива авторов также показано снижение общего уровня 5-метилцитозина (люминометрический анализ метилирования, LUMA) в лейкоцитах крови работников (промышленная радиография), подвергшихся воздействию  $\gamma$ - и рентгеновского излучений [114].

*Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК.* В уже упомянутой работе [113] показано, что средний уровень метилирования *LINE-1* элемента выше в группе облученных работников, чем у необлученных индивидов, но уменьшался с ростом тотальной дозы облучения. Показана тенденция к прямой ассоциативной связи между уровнями метилирования *LINE 1* и частотой aberrаций хроматидного типа у рабочих атомной промышленности. По мнению авторов, гетерохроматизация хроматина приводит к замедленной кинетики репарации разрывов ДНК. Напротив, в работе [114] выявлено *LINE-1* гипометилирование (бисульфитное пиросеквенирование) у специалистов по радиографии, подвергшихся воздействию редкоизионизирующей радиации на производстве (Х-лучи,  $\gamma$ -лучи). При этом отмечена обратная корреляция между уровнем метилирования *LINE-1* и частотой анеуплоидий по 1-й и 4-й хромосомам, а также между рассматриваемым эпигенетическим показателем и накоплен-

ной дозой облучения, рассчитанной при исключении значений дозовых нагрузок за последние 3 года, предшествующие исследованию. По мнению авторов, это свидетельствует о сопряженности снижения метилирования диспергированных повторов с отсроченной индукцией нестабильности генома [114].

*Локус-специфические изменения метилирования ДНК.* Имеются единичные работы, свидетельствующие о гиперметилировании промоторов генов, выявленном в нормальных и опухолевых клетках человека, подвергнувшегося внутреннему облучению за счет поступления в организм радионуклидов — источников  $\alpha$ -излучения.

Так, результаты анализа ДНК, выделенной из образцов слюны работников урановых рудников, подвергшихся пролонгированному воздействию  $\alpha$ -излучения радона, свидетельствуют о дозозависимом гиперметилировании генов *p16/INK4A* и *MGMT*. Авторы отмечают, что *MGMT* локус имеет большую склонность к рассматриваемой эпигенетической модификации в результате перенесенного пролонгированного воздействия  $\alpha$ -излучения [115].

В другой работе показано, что частота гиперметилирования гена *p16/INK4A* в аденокарциноме легкого у облученных работников ПО “Маяк” существенно превышает таковой показатель в аналогичных опухолях необлученных лиц. Выявлена зависимость метилирования локуса *p16/INK4A* в клетках этой опухоли от суммарной накопленной дозы  $\alpha$ -излучения  $^{239}\text{Pu}$ . Причем не выявлено различий в гиперметилировании *MGMT* и *DAP-K* в опухолях от облученных и необлученных лиц. Гиперметилирование гена *RASSF1A* преимущественно наблюдалось в опухолях, развившихся у лиц контрольной группы [116]. Последующее исследование образцов аденокарциномы легкого облученных работников выявило также существенно повышенную частоту гиперметилирования гена *GATA5* по сравнению с таковым показателем в опухолях необлученных лиц. Причем анализ метилирования промоторов пяти генов (*p16/INK4A*, *GATA5*, *PAX5beta*, *MGMT* и *DAP-K*) показал, что гиперметилирование, по крайней мере, одного гена наблюдалось в 93 и 66% аденокарцином от облученных работников и необлученных индивидов соответственно. Частота аденокарцином, индуцированных у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, с метилированием трех и более генов двукратно превышала этот показатель в опухолях от необлученных индивидов [117].

На двух независимых выборках облученных лиц (ликвидаторы аварии на ЧАЭС и работники ПО “Маяк”) автором настоящей обзорной статьи показана реальность гиперметилирования CpG-островков промоторов некоторых генов (в частности, *p16/INKA* и *GSTP1*), выявляемого в нор-

мальных лейкоцитах крови в отдаленный период после радиационного воздействия (метилчувствительная ПЦР) [118]. Дальнейшие обследования работников ПО “Маяк” с индивидуальными рассчитанными накопленными дозами внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения или комбинированного действия внешнего  $\gamma$ -/внутреннего  $\alpha$ -излучений, выполненные с расширением спектра анализируемых локусов, выявили совокупность *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1* генов, гиперметилирование которых ассоциировано с радиационным воздействием. Показана зависимость доза-эффект для выраженности рассматриваемых эпигенетических изменений [119–121].

Анализ сопряженности изменений паттерна метилирования генов (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) с проживанием в помещениях с повышенной удельной активностью радона ( $>200$  Бк/м<sup>3</sup>) показал как гипометилирование, так и гиперметилирование ряда CpG-сайтов, ассоциированное с воздействием излучения, как у беременных матерей, так и у их детей, обследованных с момента рождения до 15 лет. Те или иные выявленные эпигенетические изменения в локусах, потенциально ассоциированные с аномалиями в амниотической жидкости и врожденными уродствами (*PMM2*), карциномой легких (*HCG14*), глиобластомой и болезнью Альцгеймера (*NDRG2*), нефротическим синдромом (*SGPL1*), наблюдались только в определенные периоды онтогенеза [122].

#### МЕХАНИЗМЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Хотя накопилось достаточно много феноменологических данных, механизмы радиационно-индуцированных изменений метилирования остаются не выясненными. Что касается механизмов снижения тотального уровня метилирования генома, некоторые исследователи это связывают с индукцией повреждений ДНК и последующей активацией механизмов их репарации. ДНК-полимеразы, вовлеченные в репарацию и рекомбинацию, используют для репарационного синтеза цитозин, а не метилцитозин [84, 89]. Во-вторых, есть мнение, что радиационно-индуцированные повреждения ДНК интерферируют со способностью ДНК-метилтрансфераз метилировать ДНК. По-видимому, этот механизм имеет место в первое время после облучения, когда проходят репарационные процессы. Кроме того, речь должна идти об активно пролиферирующих клетках [97]. В-третьих, снижение метилирования ДНК после облучения может быть результатом уменьшения экспрессии *de novo* ДНК-метилтрансфераз — ранний ответ клетки на повреждение. Действительно, в экспериментальных работах показана сопряженность гипометилирования ДНК и супрес-

сии ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B в клетках тимуса, селезенки, печени животных, подвергшихся радиационному воздействию [84, 87]. Авторы также не исключают возможность повышения экспрессии некоторых энзимов с ДНК-деметилюющей активностью. Кроме того, в результате облучения возможно повышение экспрессии ряда микроРНК (например, miR-29, miR-141, miR-152), мишенями которых являются мРНК метилтрансфераз [123, 124]. Не исключено индуцированное радиацией ингибирование синтеза метионина и/или его трансформации в S-аденозилметионин — донора метильных групп [97]. Возможна и радиационно-индуцированная стимуляция клеточной пролиферации при отсутствии достаточного функционирования DNMT1, обеспечивающего воспроизведение родительского характера метилирования в дочерних цепях ДНК [125].

Относительно механизмов индукции гиперметилирования под действием радиации нельзя исключать, что активные формы кислорода приводят к сверхрегуляции активности ДНК-метилтрансфераз. Кроме того, индуцированные облучением разрывы ДНК могут приводить к рекрутированию ДНК-метилтрансфераз к специфическим сайтам репарации ДНК, индуцируя метилирование CpG-динуклеотидов, находящихся вблизи повреждений ДНК [126, 127].

Так, показано, что O<sup>(6)</sup>meG — одно из повреждений, индуцированное воздействием на ДНК некоторых продуктов метаболизма и метилирующих мутагенов окружающей среды, приводит к изменению метилирования атома углерода (в пятом положении) в цитидиновом остатке CpG пары путем изменения стабильности DNMT3A-CD (комплекс: поврежденный ДНК-дуплекс и DNMT3A-CD-каталитического домена метилтрансферазы DNMT3A) [128]. С использованием лазерной системы микрооблучения (с целью индукции повреждений генома в определенной области ядра) и флуоресцентных антител к ДНК-метилтрансферазам DNMT1, DNMT3A, DNMT3B1 и ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) показана роль только DNMT1 в восстановлении эпигенетической информации, сопряженного с процессом репарации ДНК [129].

Интересен факт, что ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3A, экспрессирующиеся в постмитотических нейронах, играют важную роль в функционировании центральной нервной системы, а именно в процессах запоминания и обучения. Так, мыши, накаутированные по генам этих двух ферментов, показали нарушение пластичности синаптических структур в области гиппокампа, уменьшение размера нейронов, дисрегуляцию экспрессии генов MHC класса I и локуса *Stat1*, резкое снижение метилирования ДНК, а в

конечном счете — нарушение процессов запоминания и обучения [130]. Хотя, разумеется, функционирование нервных клеток имеет свои особенности: по-видимому, существует единый механизм, посредством которого клетки сохраняют и передают информацию в условиях воздействия генотоксикантов и других стрессовых факторов. Роль ДНК-метилтрансфераз в радиочувствительности и выраженности немишенного эффекта, изученных на модели ЭС клеток, уже обсуждалась ранее [77].

Судя по всему, механизм радиационно-индуцированного изменения метилирования сложный и может вовлекать многие пути. Так, в уже упомянутой работе показано, что на 7-й день после воздействия на мышей C57BL/6J протонов или ионов железа <sup>56</sup>Fe в клетках сердца животных экспрессия *DNMT1* и *DNMT3A*, а также *UHRF1*, вовлеченных в репарацию ДНК, была увеличена [98]. Это может быть связано с ответом клетки на индукцию повреждений ДНК [131]. Имеются экспериментальные доказательства других исследователей, что сверхэкспрессия *UHRF1* приводит к индукции гипометилирования [132]. Напротив, в более отдаленные сроки после облучения (90-й день), экспрессия ДНК-метилтрансфераз и белка MeCP2 существенно снижена, что, по мнению авторов, может являться компенсаторным механизмом в условиях индуцированного гиперметилирования. При этом синтез доноров метильных групп (метионин, SAM) был существенно повышен на 90-й день после облучения и незначительно понижен на 7-е сутки после воздействия радиации, что может быть механизмом выявленных изменений в паттерне метилирования. Кроме того, гиперметилирование генома в отдаленный срок сопровождалось снижением экспрессии белка TET1, вовлеченного в конверсию метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин [98].

Как уже отмечалось выше, очень часто о глобальном уровне 5-метилцитозина судят по показателям метилирования диспергированных повторов. С одной стороны, метилирование повторяющихся последовательностей ДНК, в первую очередь, транспозонов и ретротранспозонов, является необходимым условием их “сайлейсинга”, т.е. предотвращает реактивацию генной экспрессии и развитие геномной нестабильности. Так, показано, что кратковременное гипометилирование (96 ч после облучения: рентгеновское излучение, 0.1–2.5 Гр) промотора *LINE-1* элемента приводило к долговременным эффектам (12–24 нед после облучения) реактивации диспергированного повтора: повышенным уровням экспрессии *LINE-1 ORF1* и трансляции 148-kDa *LINE-1* протеина в клетках молочной железы крыс. Эти эпигенетические изменения сопровождалось возрастанием количества c-MYC белка, что может являться результатом инсерций *LINE-1* копий в

онкоген [133]. Сопряженность эпигенетических изменений *LINE-1* промотора (или выявленных инсерций повтора в онкоген) с активацией онкогенов *c-MET* и *c-MYC* наблюдалась и в более ранних работах других авторов в клетках злокачественных опухолей у пациентов с хроническим миелолейкозом и раком молочной железы [134, 135]. Показано, что повышенная частота L1-ретротранспозиций в облученных клетках является эндонуклеаз-зависимой и пропорциональна количеству фосфорилированных H2AX фокусов, а значит, сопряжена с индукцией двунитевых разрывов ДНК в сайтах интеграции, что является одним из механизмов нестабильности генома при активации *LINE-1* [136]. Показано, что инсерция *L1* в интрон гена может приводить к подавлению экспрессии локусов. По сути, гипометилированный интрогенный *L1* является siРНК опосредованным цис-регуляторным элементом, который может репрессировать гены посредством образования многокомпонентного нуклеопротеидного комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), обеспечивающего сайленсинг генов по механизму РНК-интерференции, и в состав которого входит белок семейства Argonaute – Ago2. Это один из механизмов подавления экспрессии генов-онкосупрессоров в клетках раковых опухолей [137].

С другой стороны, в последние годы установлено, что многие нкРНК (например, днРНК, микроРНК) состоят из последовательностей повторяющихся элементов генома, в частности, транспозонов [138, 139]. Поэтому возможна большая роль повторов в регуляции альтернативного процессинга мРНК и генерации регуляторных РНК. Нарушения в экспрессии генов могут быть вызваны изменениями в структуре хроматина в гиперметилированных транспозонах, что обеспечивает транскрипционные преграды для близлежащих энхансеров и сайленсеров. В таком случае гиперметилирование повторов может также иметь решающее значение в развитии опухолевых и других патологий.

В то же время повышение тотального уровня метилирования генома в результате хронического воздействия радиации в малых дозах выявлено не только в исследованиях *in vivo* [140–142], но и *in vitro* [143]. Показано, что индукция гиперметилирования генома, индуцированная пролонгированным облучением в малых дозах, играет существенную роль в адаптивном ответе. Так, обработка В-лимфобластных клеток линии НМу2.CIR 5-aza-dC приводила к отмене адаптивного ответа в эксперименте с адаптирующим низкоинтенсивным пролонгированным (4 нед, воздействие 3 раза в неделю, 0.78 Гр/мин) действием  $\gamma$ -излучения в суммарной дозе 0.032 Гр и последующим повреждающим воздействием (2 Гр). По мнению авторов, глобальное гиперметилирование генома является защитной реакцией, направленной на со-

хранение его стабильности. Эта эпигенетическая модификация приводит к формированию конденсированного гетехроматина, более резистентного к индукции повреждений ДНК под действием радиации [143].

Показано, что радиационно-индуцированные изменения метилирования не всегда сопровождаются отрицательной ассоциативной связью с транскрипционной активностью соответствующих генов или повторов и положительной корреляцией с экспрессией ДНК-метилтрансфераз [91, 94, 96–98, 101]. Это является доказательством того, что регуляция экспрессии определяется не только метилированием ДНК, но и другими механизмами, в частности, модификацией гистонов. Например, радиационно-индуцированное повышение экспрессии *LINE-1* ORF1 и ORF2 было обусловлено не снижением их метилирования, а модификацией гистонов, а именно, потерей диметилирования гистоном H3K9 и увеличением триметилирования H3K4 в 5'-UTRs регионе *LINE-1* [101].

Возможно, что индукция двунитевых разрывов, окислительных повреждений ДНК приводит к рекрутированию ДНК-метилтрансфераз (например, с участием белков репарации неспаренных нуклеотидов MSH2-MSH6) и других модификаторов гистонов, таких как белки группы polycomb (ингибиторные комплексы 1 и 2: PRC1 и PRC2), метилтрансфераза EZH2, сиртуины (например, SIRT1 катализирует деацетилирование остатков лизина в гистонах), что должно опосредовать временную локальную репрессию хроматина, препятствующую транскрипции. Репарация повреждений ДНК – это динамический процесс, который требует как открытого, так и конденсированного хроматина, а значит сопряжен с процессами ацетилирования и деацетилирования гистонов. В свою очередь, последние могут быть высокоспецифичны в отношении расстояния от сайта повреждения: ацетилирование имеет место в непосредственной близости от разрыва, а обратный процесс – на расстоянии нескольких нуклеосом от него. Кроме того, не исключена зависимость хронологии этих процессов от времени, прошедшего после индукции повреждения ДНК: ацетилирование гистонов происходит вслед за возникновением этого повреждения, а деацетилирование – после окончания восстановления генетической структуры [144–147]. Поэтому ошибки этих процессов, отсутствие их своевременной остановки и нарушения скоординированности, что, по-видимому, имеет место при хроническом действии генотоксических факторов, приводят к эпигенетическим модификациям, которые могут сохраняться длительное время в последующих клеточных делениях (например, гиперацетилированный H4K16, H3K9me2 и me3, and H3K27me3). Показано, что такие

плотноионизирующие излучения как ионы углерода  $^{14}\text{C}$  вызывают труднорепарируемые кластерные повреждения вдоль трека частиц, локализованные в гетерохроматиновых регионах [148].

Экспериментально показано, что независимые от репликации эндогенные двунитевые разрывы ДНК (RIND-EDSBs) сохраняются преимущественно в метилированных участках генома в неацетилованном хроматине, поскольку существует временная задержка между индукцией этих повреждений и репарацией. Быстрый ответ клетки на индукцию повреждений ДНК ( $\gamma$ -H2AX) в этом случае блокируется компактной структурой хроматина, которая потом позволяет восстановиться EDSBs путем негомологичной рекомбинации, осуществляемой более точным АТМ-зависимым способом. Деметилирование ДНК сопряжено с эухроматизацией хроматина, а разрывы, возникшие в таких регионах, будут восстанавливаться Ku-опосредованной NHEJ, в наибольшей степени склонной к ошибкам, что приводит к нарастанию нестабильности этих регионов генома [149, 150].

#### ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИГЕНОМА

Представленные выше данные свидетельствуют о разнообразии спектра радиационно-индуцированных нарушений метилирования ДНК. Учитывая классический постулат о преждевременном старении облученного организма, в последнем разделе обзора считаем целесообразным кратко изложить все возраст-ассоциированные изменения эпигенома, касающиеся как метилирования ДНК, так и взаимосвязанных с ним процессов модификации гистонов:

1. Снижение тотального уровня гетерохроматина, сопровождаемое снижением уровней гетерохроматинового протеина HP1 и триметилированного гистона H3K9 (H3K9me3), а также изменениями в ламине A1 [151].

2. Формирование гетерохроматиновых фокусов, ассоциированных со старением (SAHF), в прежде эухроматиновых регионах, что запускается триметилированием H3K9, связыванием протеина HP1 и включением тасгоH2A-альтернативного вариантного гистона, заменяющего канонический H2A, а также HMGА (негистоновый белок хроматина с высокой электрофретической подвижностью группы А). Этот нестохастический процесс “перераспределения” хроматина вовлекает множество гетерохроматиновых протеинов, включая гистоновые шапероны [151].

3. АТФ-зависимое ремоделирование структуры хроматина, сопряженное с изменением ДНК-гистоновых контактов и являющееся результатом действия ряда механизмов. Во-первых, это

уменьшение количества канонических коровых гистонов (потеря трансляции и нарушения в экспрессии генов как результат модификации гистонов в гистон-кодирующих генах) и их замена вариантными, например, H3.3, H3.3cs1, а также тасгоH2A, способного запускать секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP, senescence associated secretory phenotype). Во-вторых, имеет место сборка нуклеосом в состав хроматина или их удаление, а также изменение позиции этих единиц хроматина по отношению к последовательности ДНК. Хроматин-ремоделирующие комплексы работают в комбинации с другими протеинами, такими как гистон-модифицирующие ферменты (метилтрансферазы, ацетилазы, деацетилазы и др.) [151].

4. Посттрансляционные модификации определенных аминокислотных остатков гистонов на N-терминальном конце (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, рибозилирование и др.). Показано, что в целом с возрастом повышается уровень эпигенетических маркеров, сопряженных с активной транскрипцией: триметилирование H3K4 (H3K4me3) и ацетилирование H4K16 (H4K16ac). Количество модифицированных гистонов, ассоциированных с транскрипционным сайленсингом и формированием гетерохроматина (H3K9me3, H3K27me3, H4K20me2 и H3K56ac), наоборот, падает. Однако имеет место и перераспределение рассматриваемых эпигенетических модификаций в пределах генома [151].

5. Релокализация хроматин-модифицирующих факторов, что лежит в основе одной из концепций эпигенетического старения и связано с механизмами ответа клетки на повреждение ДНК. Индукция последнего приводит к перемещению рассматриваемых факторов (например, сиртуины SIRT1 и SIRT6, гистоновая деацетилаза HDAC1) от регулируемых ими канонических локусов в область этого повреждения для участия в репарации ДНК. С возрастом происходит накопление ошибок восстановления исходного расположения модификаторов хроматина, приводя к aberrантной экспрессии диспергированных повторов и ряда молчащих генов [151].

6. Изменения экспрессии нкРНК (например, H19, miR-34 и др.) [151].

7. Повышение транскрипции транспозонов (*LINE-1*, *Alu*, сателлитные повторы), что связано с возраст-ассоциированным снижением гетерохроматизации и метилирования ДНК, а также с релокализацией (к сайтам нестабильности ДНК) SIRT1 деацетилазы (репрессора транспозонов) и истощением SIRT6 в течение старения. Считается, что экспрессия рассматриваемых повторов может вносить вклад в воспалительный SASP ответ [152].

8. Изменение локализации и экспрессии множества транскрипционных факторов, таких как ключевой страж стабильности генома p53, CTCF, имеющий домен цинковых пальцев, нейрорезистентный фактор REST, ингибирующий связывание Polycomb — репрессирующих комплексов PRC1 и PRC2 с участками вблизи промотора, HSF1 (фактор теплового шока 1), являющийся регулятором экспрессии гена *Hsp70*. Кроме того, FOXO (контроль стресс-ответа, метаболизма, нейрональных функций) связывается с активным хроматином в энхансерных регионах и может действовать как фактор, инициирующий расщепление компактного хроматина; его активность регулируется AMP-активированной протеинкиназой и IGF1 (инсулин-зависимый фактор роста) ассоциированными путями, а также окислительным стрессом. Другой фактор транскрипции NRF2 модулирует экспрессию генов защитных систем клетки, активируется активными формами кислорода, метаболическими изменениями (меняется активность mTOR и IGF1) и действует путем рекрутирования хроматин-ремоделирующих факторов, таких как нуклеосом-ремоделирующий комплекс BRG2, чтобы активировать ген стресс-ответа. Показано, что все упомянутые факторы сопряжены с продолжительностью жизни и старением индивидов [153–159].

9. Тотальное гипометилирование генома и гиперметилирование промоторов генов. Предполагается, что возраст-ассоциированные изменения в транскрипционных факторах и гистон-модифицирующих энзимах влияют на метилирование ДНК и наоборот. В течение старения метилирование генов-мишеней белков группы Polycomb (PcGTs) изменяется, что является возможным объяснением изменения с возрастом триметилирования H3K27 [11, 12, 160–162]. Повышение метилирования ДНК имеет место в регионах с H3K27me3, а понижение — ассоциировано с такими активными гистоновыми метками хроматина, как ацетилирование H3K9 (H3K9ac), H3K27 (H3K27ac) и метилирование H3K4 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) [163, 164].

Представляется, что возраст-ассоциированные изменения эпигенома — это, с одной стороны, результат реализации “закодированной” программы онтогенетического развития и естественного старения, механизмы которой непонятны. Так, нельзя утверждать, что CpG-часы связаны с митотическим возрастом. Несмотря на то, что темпы нарастания изменений метилирования максимальны во время наибольшей пролиферативной активности клеток организма, и эпигенетический возраст (DNAm) коррелирует с порядковым номером клеточного деления в культуре, он “отслеживает” также календарный возраст в непролиферативных тканях. С другой стороны, DNAm не является маркером клеточного

старения, так как этот показатель существенно коррелирует с хронологическим возрастом иммортализованных клеток (например, В-клетки, трансформированные вирусом Эпштейна–Барр) и номером пассажа культуры бессмертных ЭС клеток. По мнению автора, DNAm — некая кумулятивная работа, сделанная определенным родом эпигенетической системой сохранности, направленная на стабилизацию генома/эпигенома [11]. В этом плане заслуживает также внимания следующий факт. Широкогеномное исследование метилома с последующим анализом выживаемости с использованием модели Кокса выявило 2552 CpG-сайта, сопряженных с риском смерти (1403 и 1149 сайтов показали положительную и отрицательную корреляцию соответственно). Однако из них меньше 30% CpG проявили связь метилирования с возрастом. Причем для большинства этих сайтов (более чем 90%) показан разнонаправленный характер ассоциаций метилирования с возрастом и со смертностью. Таким образом, получается, что такие возраст-ассоциированные эпигенетические модификации отражают ход “здорового” старения и носят “полезный” характер для выживаемости индивида. CpG-динуклеотиды, метилирование которых сопряжено с повышенным риском смерти, в большей степени расположены в “теле” гена и межгенных промежутках, а с пониженным риском — в генных промоторах [165]. Тем не менее в геноме присутствуют десятки CpG-сайтов (а именно, 53 из 2552 CpG), метилирование которых имеет однонаправленный характер корреляций с возрастом и смертностью. Высокая точность оценки биологического возраста индивида, на основе “CpG-часов”, и его повышение по сравнению с календарным, отмечены при различных соматических заболеваниях (злокачественные новообразования, инсульты, гипертензия и др.), что подробно обсуждалось в наших предыдущих публикациях [11–15].

С другой стороны, изменения эпигенома, ассоциированные с возрастом, — это результат накопления “стохастических” событий — эпигенетических модификаций, сопряженных с ошибками воспроизведения паттерна метилирования в митотических потомках клеток, активацией клеточных программ и индукцией повреждений ДНК в результате действия эндо-/экзогенных стрессовых факторов, в том числе генотоксикантов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях с использованием культур клеток и лабораторных животных выявлен широкий спектр нарушений метилирования ДНК, индуцированных ионизирующими излучениями как с высокой, так и низкой ЛПЭ (тотальное гипо-/гиперметилирование, гипо-/гиперметилиро-



**Рис. 1.** Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК и структурно-функциональная дестабилизация генома клеток.

**Fig. 1.** Radiation-induced changes in DNA methylation and structural/functional destabilization of the cell genome.

вание повторяющихся элементов генома, локус-специфическое гипо-/гиперметилирование). Они наблюдаются не только сразу после облучения, но и могут сохраняться на протяжении длительного периода времени. На рис. 1 подытожены имеющиеся сведения о последствиях этих эпигенетических модификаций для функционирования клеточного генома. Результаты единичных работ указывают на то, что выраженность и направленность изменений паттерна метилирования, как повторов, так и генов, зависят от структурной области, к которой относятся изученные CpG-сайты (CpG-островок промотора или транскрибируемая часть гена, *LINE-1* ORF1 или *LINE-1* 5'-UTRs, эволюционный возраст повтора). К сожалению, в большинстве работ в этом аспекте полученные данные не анализируются. В ряде исследований выявлены зависимости доза-эффект и мощность дозы-эффект для уровня нарушений в паттерне метилирования ДНК. Показана сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немисшеных эффектов радиации, как геномная нестабильность и "эффект свидетеля"; это направление исследований является крайне важ-

ным в аспекте радиотерапии злокачественных новообразований. На данный момент получено достаточно много данных в области молекулярной онкологии, касающихся связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Хотя установлено, что радиорезистентный фенотип таких клеток ассоциирован с гиперметилированием промоторов множества генов, механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование.

На настоящий момент имеются единичные исследования, свидетельствующие о реальности дозозависимой индукции и сохранении в течение длительного времени тех или иных эпигенетических модификаций в лейкоцитах крови облученного человека. Так как старение, последствия радиационного воздействия и возраст-ассоциированные заболевания сопровождаются общими эпигенетическими нарушениями, рассматриваемая проблема является одной из наиболее важных в области молекулярной радиобиологии и геронтологии человека.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично выполнена в рамках темы государственного задания Минобрнауки России “Генетические технологии в биологии, медицине, сельскохозяйственной и природохозяйственной деятельности” (№ 0112-2019-0002), подтемы “Генотоксиканты и антигенотоксиканты окружающей среды: маркеры отдаленного воздействия и генетические риски развития широко распространенных заболеваний”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виленчик М.М.* Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. М.: Энергоатомиздат, 1987. 192 с. [*Vilenchik M.M.* DNA Instability and long-term effects of radiation exposure. Moscow: Energoatomizdat. 1987. 192 p. (in Russian)]
2. *Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J. et al.* Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature*. 2009. V. 461. № 7265. P. 747–753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
3. *Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J.* Five years of GWAS discovery // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V.90. № 1. P. 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>
4. *Morgan W.F.* Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects // *Radiat. Res.* 2003. V. 159. № 5. P. 581–596. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0581:na-deoe\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0581:na-deoe]2.0.co;2)
5. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Балева Л.С., Сипягина А.Е.* Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006. Т. 46. № 2. С. 167–177. [*Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Baleva L.S., Sipyagina A.E.* Problema inducirovannoy genomnoy nestabil'nosti kak osnovy povyshennoy zaboлеваemosti u detej, podvergayushchihsia nizkointensivnomu vozdeystviyu radiacii v malyh dozah // *Radiac. biologiya. Radioekologiya*. 2006. T. 46. № 2. S. 167–177. (in Russian)]
6. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. и др.* Индивидуальные особенности трансгенерационной геномной нестабильности у детей ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (цитогенетические и иммуногенетические показатели) // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008. Т. 48. № 3. С. 278–286. [*Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Suskova V.S. i dr.* Individual'nye osobennosti transgeneracionnoy genomnoy nestabil'nosti u detej likvidatorov posledstviy avarii na SNAES (citogeneticheskie i immunogeneticheskie pokazateli) // *Radiac. biologiya. Radioekologiya*. 2008. T. 48. № 3. S. 278–286. (in Russian)]
7. *Пелевина И.И., Петушкова В.В., Бирюков В.А. и др.* Роль “немишеных эффектов” в реакции клеток человека на радиационное воздействие // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019. Т. 59. № 3. С. 261–273. [*Pelevina I.I., Petushkova V.V., Biryukov V.A. i dr.* Rol' “nemishennyh effektov” v reakcii kletok cheloveka na radiacionnoe vozdeystvie // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2019. T. 59. № 3. S. 261–273 (in Russian)] <https://doi.org/10.1134/S086980311903010X>
8. *Tharmalingam S., Sreetharan S., Kulesza A.V. et al.* Low-Dose Ionizing Radiation Exposure, Oxidative Stress and Epigenetic Programming of Health and Disease // *Radiat. Res.* 2017. V. 188. Issue 4. P. 525–538. <https://doi.org/10.1667/RR14587.1>
9. *Mothersill C., Rusin A., Fernandez-Palomo C., Seymour C.* History of bystander effects research 1905–present; what is in a name? // *Int. J. Radiat. Biol.* 2018 V. 94. № 8. P. 696–707. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1398436>
10. *Нугис В.Ю., Козлова М.Г.* Проблема связи частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови с риском развития заболеваний, в том числе после действия радиации // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017. Т. 57. № 1. С. 18–29. [*Nugis V.Yu., Kozlova M.G.* Problema svyazi chastoty aberracij hromosom v limfocitah perifericheskoy krovi s riskom razvitiya zaboлеваenij, v tom chisle posle deystviya radiacii // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017. T. 57. № 1. S. 18–29 (in Russian)] <https://doi.org/10.7868/S0869803116060072>
11. *Horvath S.* DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 10. R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
12. *Hannum G., Guinney J., Zhao L. et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates // *Mol. Cell.* 2013. V. 49. № 2. P. 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
13. *Marioni R.E., Shah S., McRae A.F. et al.* The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936 // *Int. J. Epidemiol.* 2015. V. 44. № 4. P. 1388–1396. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277>
14. *Soriano-Tárraga K., Giralt-Steinhauer E., Mola-Caminal M. et al.* // Ischemic stroke patients are biologically older than their chronological age // *Aging*. V. 8. № 11. P. 2655–2666. <https://doi.org/10.18632/aging.101028>
15. *Zampieri M., Ciccarone F., Calabrese R. et al.* // Reconfiguration of DNA methylation in aging // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2015. V. 151. P. 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.02.002>
16. *Jones P.A., Takai D.* The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001. V. 293. № 5532. P. 1068–1070 (New York, N.Y.). <https://doi.org/10.1126/science.1063852>
17. *Suzuki M.M., Bird A.* DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics // *Nat. Rev.* 2008. V. 9. № 6. P. 465–476. <https://doi.org/10.1038/nrg3241>
18. *Jones P.A.* Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat. Rev.* 2012. V. 13. № 7. P. 484–92. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
19. *Pfeifer G.P.* Mutagenesis at methylated CpG sequences // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 301. P. 259–

281.  
[https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7_10)
20. *Bird A.P.* DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA // *Nucleic Acids Res.* 1980. V. 8. № 7. P. 1499–504.  
<https://doi.org/10.1093/nar/8.7.1499>
  21. *Robertson K.D., Wolffe A.P.* DNA methylation in health and disease // *Nat. Rev.* 2000. V. 1. № 1. P. 11–19.  
<https://doi.org/10.1038/35049533>
  22. *Jaco I., Canela A., Vera E., Blasco M.A.* Centromere mitotic recombination in Mammalian cells // *J. Cell Biol.* 2008. V. 181. № 6. P. 885–892.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200803042>
  23. *Blasco M.A.* The epigenetic regulation of mammalian telomeres // *Nat. Rev.* 2007. V. 8. № 4. P. 299–309.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2047>
  24. *Tomso D.J., Bell D.A.* Sequence context at human single nucleotide polymorphisms: overrepresentation of CpG dinucleotide at polymorphic sites and suppression of variation in CpG islands // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. № 2. P. 303–8.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00120-7)
  25. *Kulis M., Queirós A.C., Beekman R., Martín-Subero J.I.* Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 11. P. 1161–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.001>
  26. *Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M. et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters // *Nature.* 2010. V. 466. № 7303. P. 253–7.  
<https://doi.org/10.1038/nature09165>
  27. *Whitfield B.L., Billen D.* *In vivo* methylation of *Escherichia coli* DNA following ultraviolet and X-irradiation // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 63. № 3. P. 363–372.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90433-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90433-0)
  28. *Kalinich J.F., Catravas G.N., Snyder S.L.* The Effect of  $\gamma$  Radiation on DNA Methylation // *Radiat. Res.* 1989. V. 117. № 2. P. 185–197.
  29. *Tawa R., Kimura Y., Komura J. et al.* Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues // *J. Radiat. Res.* 1998. V. 39. № 4. P. 271–278.  
<https://doi.org/10.1269/jrr.39.271>
  30. *Chaudhry M.A., Omaruddin R.A.* Differential DNA Methylation Alterations in Radiation-Sensitive and Resistant Cells // *DNA and Cell Biology.* 2012. V. 31. № 6. P. 908–916.  
<https://doi.org/10.1089/dna.2011.1509>
  31. *Lin R.K., Wu C.Y., Chang J.W. et al.* Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 14. P. 5807–5817.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4161>
  32. *Peterson E.J., Bogler O., Taylor S.M.* p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 20. P. 6579–6582.
  33. *Tang X., Milyavsky M., Shats I. et al.* Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 34. P. 5759–5769.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207706>
  34. *Maierhofer A., Flunkert J., Dittrich M. et al.* Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 5. e0177442.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177442>
  35. *Kuhmann C., Weichenhan D., Rehli M. et al.* DNA methylation changes in cells regrowing after fractionated ionizing radiation // *Radiother. Oncol.* 2011. V. 101. № 1. P. 116–121.  
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.048>
  36. *Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y. et al.* Gamma Irradiation Does Not Induce Detectable Changes in DNA Methylation Directly following Exposure of Human Cells // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 9. e44858.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044858>
  37. *Kennedy E.M., Powell D.R., Li Z. et al.* Galactic Cosmic Radiation Induces Persistent Epigenome Alterations Relevant to Human Lung Cancer // *Scientific Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 6709.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24755-8>
  38. *Becker B.V., Kaatsch L., Obermair R. et al.* X-ray irradiation induces subtle changes in the genome-wide distribution of DNA hydroxymethylation with opposing trends in genic and intergenic regions // *Epigenetics.* 2019. V. 14. № 1. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1568807>
  39. *Ma S., Liu X., Jiao B. et al.* Low-dose radiation-induced responses: Focusing on epigenetic regulation // *Int. J. Radiat. Biol.* 2010. V. 86. № 7. P. 517–528.
  40. *Kejik Z., Jakubek M., Kaplánek R. et al.* Epigenetic agents in combined anticancer therapy // *Future Med. Chem.* 2018. V. 10. № 9. P. 1113–1130.  
<https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0203>
  41. *Zielske S.P.* Epigenetic DNA Methylation in Radiation Biology: On the Field or on the Sidelines? // *J. Cell. Biochem.* 2014. V. 116. № 2. P. 212–217.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.24959>
  42. *Antwiw D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D. et al.* Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways // *Epigenetics.* 2013. V. 8. № 8. P. 839–848.  
<https://doi.org/10.4161/epi.25498>
  43. *Cacan E., Greer S.F., Garnett-Benson C.* Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases // *Int. J. Oncol.* 2015. V. 47. № 6. P. 2264–2275.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3192>
  44. *Smits K.M., Melotte V., Niessen H.E.C. et al.* Epigenetics in radiotherapy: Where are we heading? // *Radiother. Oncol.* 2014. V. 111. № 2. P. 168–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.05.001>
  45. *Roy K., Wang L., Makrigiorgos G.M., Price B.D.* Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 344. № 3. P. 821–826.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.222>
  46. *Leung R.C., Liu S.S., Chan K.Y. et al.* Promoter methylation of death-associated protein kinase and its role in irradiation response in cervical cancer // *Oncol. Rep.* 2008. V. 19. № 5. P. 1339–1345.  
<https://doi.org/10.3892/or.19.5.1339>

47. Zhou H., Miki R., Eeva M. et al. Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme // Clin. Cancer Res. 2007. V.13. № 8. P. 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2303>
48. Chen X., Liu L., Mims J. et al. Analysis of DNA methylation and gene expression in radiation-resistant head and neck tumors // Epigenetics. 2015. V. 10. № 6. P. 545–561. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1048953>
49. Kim E-H., Park A-K., Dong S.M. et al. Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines // Oncogene. 2010. V. 29. № 33. P. 4725–4731. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.223>
50. Kim Jae-S., Kim S.Y., Lee M. et al. Radioresistance in a human laryngeal squamous cell carcinoma cell line is associated with DNA methylation changes and topoisomerase II  $\alpha$  // Cancer Biol. Ther. 2015. V. 16. № 4. P. 558–566. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1017154>
51. Luzhna L., Kovalchuk O. Modulation of DNA methylation levels sensitizes doxorubicin-resistant breast adenocarcinoma cells to radiation-induced apoptosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 392. № 2. P. 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.093>
52. Hoffman D.R., Cornatzer W.E., Duerre J.A. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions // Can. J. Biochem. 1979. V. 57. № 1. P. 56–65. <https://doi.org/10.1139/o79-007>
53. Stavrovskaya A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells // Biochemistry. 2000. № 65. № 1. P. 95–106. (in Russian)
54. Rivera A.L., Pelloski C.E., Gilbert M.R. et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma // Neuro Oncol. 2010. V. 12. № 2. P. 116–121. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop020>
55. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E. et al. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. № 19. P. 1350–1354. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>
56. Niyazi M., Schnell O., Suchorska B. et al. FET-PET assessed recurrence pattern after radio- chemotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma is influenced by MGMT methylation status // Radiother. Oncol. 2012. V. 104. № 1. P. 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.04.022>
57. Miousse I.R., Koturbash I. The fine LINE: methylation drawing the cancer landscape // BioMed. Res. Int. 2015. V. 2015. Art. ID 131547, 8 p. <https://doi.org/10.1155/2015/131547>
58. Dote H., Cerna D., Burgan W.E. et al. Enhancement of In vitro and In vivo Tumor Cell Radiosensitivity by the DNA Methylation Inhibitor Zebularine // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 12. P. 4571–4579. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0050>
59. Kim H.J., Kim J.H., Chie E.K. et al. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity // Radiat. Oncol. 2012. V. 7. P. 39. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-39>
60. De Schutter H., Kimpe M., Isebaert S., Nuyts S. A systematic assessment of radiation dose enhancement by 5-Aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitors in head-and-neck squamous cell carcinoma // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. V. 73. № 3. P. 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.032>
61. Camphausen K., Burgan W., Cerra M. et al. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of  $\gamma$ H2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275 // Cancer Res. 2004. V. 64. № 1. P. 316–321. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2630>
62. Camphausen K., Cerna D., Scott T. et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid // Int. J. Cancer. 2005. V. 114. № 3. P. 360–366. <https://doi.org/10.1002/ijc.20774>
63. Geng L., Cuneo K.C., Fu A. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer // Cancer Res. 2006. V. 66. № 23. P. 11298–11304. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0049>
64. Stoilov L., Darroudi F., Meschini R. et al. Inhibition of repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in human lymphocytes exposed to sodium butyrate // Int. J. Radiat. Biol. 2000. V. 76. № 11. P. 1485–1491. <https://doi.org/10.1080/09553000050176243>
65. Qiu H., Yashiro M., Shinto O. et al. DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells // Cancer Sci. 2009. V. 100. № 1. P. 181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01004.x>
66. Ahn M.Y., Jung J.H., Na Y.J., Kim H.S. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaphin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells // Gynecol. Oncol. 2008. V. 108. № 1. P. 27–233. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.098>
67. Li Y., PeiLiang Geng P., Jiang W. et al. Enhancement of radiosensitivity by 5-Aza-CdR through activation of G2/M checkpoint response and apoptosis in osteosarcoma cells // Tumor Biol. 2014. V. 35. № 5. P. 4831–4839. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1634-5>
68. Shin D.Y., Sung Kang H., Kim G.Y. et al. Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells // Biomed. Pharmacother. 2013. V. 67. № 4. P. 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.01.004>
69. Jiang W., Li Y.Q., Liu N. et al. 5-Azacytidine enhances the radiosensitivity of CNE2 and SUNE1 cells in vitro and in vivo possibly by altering DNA methylation // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. e93273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093273>
70. Bansal N., Mims J., Kuremsky J.G. et al. Broad phenotypic changes associated with gain of radiation resis-

- tance in head and neck squamous cell cancer // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. V. 21. № 2. P. 221–236. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5690>
71. *Mims J., Bansal N., Bharadwaj M.S. et al.* Energy metabolism in a matched model of radiation resistance for head and neck squamous cell cancer // *Radiat. Res.* 2015. V. 183. № 3. P. 291–304. <https://doi.org/10.1667/RR13828.1>
  72. *Aypar U., Morgan W.F., Baulch J.E.* Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations // *Mutat. Res.* 2011. V. 707. № 1–2. P. 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.003>
  73. *Aypar U., Morgan W.F., Baulch J.E.* Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? // *Int. J. Radiat. Biol.* 2011. V. 87. № 2. P. 179–191. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.522686>
  74. *Goetz W., Morgan M.N., Baulch J.E.* The effect of radiation quality on genomic DNA methylation profiles in irradiated human cell lines // *Radiat. Res.* 2011. V. 175. № 5. P. 575–587. <https://doi.org/10.1667/RR2390.1>
  75. *Kaup S., Grandjean V., Mukherjee R. et al.* Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes // *Mutat. Res.* 2006. V. 597. № 1–2. P. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.032>
  76. *Tsumura A., Hayakawa T., Kumaki Y. et al.* Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b // *Genes Cells.* 2006. V. 11. № 7. P. 805–814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x>
  77. *Rugo R.E., Mutamba J.T., Mohan K.N. et al.* Methyltransferases mediate cell memory of a genotoxic insult // *Oncogene.* 2011. V. 30. № 6. P. 751–756. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.480>
  78. *Armstrong C.A., Jones G.D., Anderson R. et al.* DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation // *Epigenetics.* 2012. V. 7. № 8. P. 892–902. <https://doi.org/10.4161/epi.21094>
  79. *Calvanese V., Horrillo A., Hmadcha A. et al.* Cancer genes hypermethylated in human embryonic stem cells // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 9. e3294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003294>
  80. *Wong D.J., Liu H., Ridky T.W. et al.* Module Map of Stem Cell Genes Guides Creation of Epithelial Cancer Stem Cells // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. № 4. P. 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.009>
  81. *Rakova I.A.* [Methylation of newly synthesized DNA in rat bone marrow and thymus after irradiation] // *Radiobiologiya.* 1979. V. 19. № 3. P. 413–416. (in Russian)
  82. *Giotopoulos G., McCormick C., Cole C. et al.* DNA methylation during mouse hemopoietic differentiation and radiation-induced leukemia // *Exp. Hematol.* 2006. V. 34. № 11. P. 1462–1470. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.06.008>
  83. *Koturbash I., Baker M., Loree J. et al.* Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. V. 66. № 2. P. 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.06.012>
  84. *Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V. et al.* Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus // *Mol. Cancer Res.* 2005. V. 3. № 10. P. 553–561. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0074>
  85. *Loree J., Koturbash I., Kutanzi K. et al.* Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: possible implications for radiation-induced carcinogenesis // *Int. J. Radiat. Biol.* 2006. V. 82. № 11. P. 805–815. <https://doi.org/10.1080/09553000600960027>
  86. *Tryndyak V.P., Kovalchuk O., Pogribny I.P.* Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins // *Cancer Biol. Ther.* 2006. V. 5. № 1. P. 65–70. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.1.2288>
  87. *Raiche J., Rodriguez-Juarez R., Pogribny I., Kovalchuk O.* Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 325. № 1. P. 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.002>
  88. *Kovalchuk O., Burke P., Besplug J. et al.* Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation // *Mutat. Res.* 2004. V. 548. № 1–2. P. 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.12.016>
  89. *Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O.* Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 320. № 4. P. 1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.081>
  90. *Wang J., Zhang Y., Xu K. et al.* Genome-wide screen of DNA methylation changes induced by low dose X-ray radiation in mice // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. e90804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090804>
  91. *Nzabarushimana E., Miousse I.R., Shao L. et al.* Long-term epigenetic effects of exposure to low doses of 56Fe in the mouse lung // *J. Radiat. Res.* 2014. V. 55. № 4. P. 823–828. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru010>
  92. *Jangiam W., Tungjai M., Rithidech K.N.* Induction of chronic oxidative stress, chronic inflammation and aberrant patterns of DNA methylation in the liver of titanium-exposed CBA/CaJ mice // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. V. 91. № 5. P. 389–398. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.1001882>
  93. *Elmhiri G., Gloaguen C., Grison S. et al.* DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats // *Toxicol. Lett.* 2018. V. 282. P. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.004>
  94. *Miousse I.R., Shao L., Chang J. et al.* Exposure to low-dose 56Fe-ion radiation induces long-term epigenetic alterations in mouse bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells // *Radiat. Res.* 2014. V. 182. № 1.

- P. 92–101.  
<https://doi.org/10.1667/RR13580.1>
95. Newman M.R., Sykes P.J., Blyth B.J. et al. The Methylation of DNA Repeat Elements is Sex-Dependent and Temporally Different in Response to X Radiation in Radiosensitive and Radioresistant Mouse Strains // *Radiat. Res.* 2014. V. 181. № 1. P. 65–75.  
<https://doi.org/10.1667/RR13460.1>
  96. Lima F., Ding D., Goetz W. et al. High LET  $^{56}\text{Fe}$  Ion Irradiation Induces Tissue-Specific Changes in DNA Methylation in the Mouse // *Environ. Mol. Mutagen.* 2014. V. 55. № 3. P. 266–277.  
<https://doi.org/10.1002/em.21832>
  97. Miousse I.R., Chang J., Shao L. et al. Inter-Strain Differences in LINE-1 DNA Methylation in the Mouse Hematopoietic System in Response to Exposure to Ionizing Radiation // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 7. E. 1430.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18071430>
  98. Koturbash I., Miousse I.R., Sridharan V. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation of repetitive elements in the mouse heart // *Mutat. Res.* 2016. V. 787. P. 43–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.009>
  99. Hogart A., Lichtenberg J., Ajay S.S. et al. Genome-wide DNA methylation profiles in hematopoietic stem and progenitor cells reveal overrepresentation of ETS transcription factor binding sites // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 8. P. 1407–1418.  
<https://doi.org/10.1101/gr.132878.111>
  100. Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Bagnyukova T.V. et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. № 1. P. 176–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.021>
  101. Prior S., Miousse I.R., Nzabarushimana E. et al. Densely ionizing radiation affects DNA methylation of selective LINE-1 elements // *Environ. Res.* 2016. V. 150. P. 470–481.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.043>
  102. Impey S., Pelz C., Tafessu A. et al. Proton irradiation induces persistent and tissue-specific DNA methylation changes in the left ventricle and hippocampus // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. P. 273.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2581-x>
  103. Impey S., Jopson T., Pelz C. et al. Short- and long-term effects of  $^{56}\text{Fe}$  irradiation on cognition and hippocampal DNA methylation and gene expression // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. № 1. P. 825.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3110-7>
  104. Impey S., Jopson T., Pelz C. et al. Bi-directional and shared epigenomic signatures following proton and  $^{56}\text{Fe}$  irradiation // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 102–127.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09191-4>
  105. Song W.G., Liu Y.Z., Liu Y. et al. Increased P16 DNA methylation in mouse thymic lymphoma induced by irradiation // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e93850.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093850>
  106. Bernal A.J., Dolinoy D.C., Huang D. et al. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 2. P. 665–671.  
<https://doi.org/10.1096/fj.12-220350>
  107. Nandakumar V., Vaid M., Tollefsbol T.O., Katiyar S.K. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice // *Carcinogenesis.* 2011. V. 32. № 4. P. 597–604.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq282>
  108. Zhu B., Huang X., Chen J. et al. Methylation changes of H19 gene in sperms of X-irradiated mouse and maintenance in offspring // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 340. № 1. P. 83–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.154>
  109. Koturbash I., Boyko A., Rodriguez-Juarez R., Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo // *Carcinogenesis.* 2007. V. 28. № 8. P. 1831–1838.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm053>
  110. Koturbash I., Kutanzki K., Hendrickson K. et al. Radiation-induced bystander effects in vivo are sex specific // *Mutat. Res.* 2008. V. 642. № 1–2. P. 28–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.04.002>
  111. Ilynskyy Y., Koturbash I., Kovalchuk O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner // *Environ. Mol. Mutagen.* 2009. V. 50. № 2. P. 105–113.  
<https://doi.org/10.1002/em.20440>
  112. Koturbash I., Rugo R.E., Hendricks C.A. et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 31. P. 4267–4275.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209467>
  113. 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. V. 91. № 2. P. 142–149.  
<https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
  114. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D. et al. LINE-1 Hypomethylation is Associated With Radiation-Induced Genomic Instability in Industrial Radiographers // *Environ. Mol. Mutagen.* 2018. V. 60. № 2. P. 174–184.  
<https://doi.org/10.1002/em.22237>
  115. Su S.B., Jin Y.L., Zhang W. et al. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine // *J. Occup. Health.* 2006. V. 48. № 4. P. 261–266.  
<https://doi.org/10.1539/joh.48.261>
  116. Belinsky S.A., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma // *Carcinogenesis.* 2004. V. 25. № 6. P. 1063–1067.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgh096>
  117. Lyon C.M., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Radiation-induced lung adenocarcinoma is associated with increased frequency of genes inactivated by promoter hypermethylation // *Radiat. Res.* 2007. V. 168. № 4. P. 409–414.  
<https://doi.org/10.1667/RR0825.1>
  118. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure //

- Environ. Res. 2016. V. 146. P. 10–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
119. Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русина Г.Г. и др. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 4. С. 341–356. [Kuz'mina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. i dr. Gipermetilirovanie promotorov genov v lejkocitah krovi cheloveka v otdalennyj period posle perenesennogo radiacionnogo vozdeystviya // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2017. T. 57. № 4. S. 341–356. (in Russian)]  
<https://doi.org/10.7868/S0869803117040014>
  120. Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русина Г.Г. и др. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфа-излучений // Генетика. 2018. Т. 54. Приложение. С. S22–S26. [Dozovaya zavisimost' gipermetilirovaniya promotorov genov v lejkocitah krovi lic, podvergshisya sochetannomu vozdeystviyu gamma- i al'fa-izluchenij // Genetika. 2018. T. 54. Prilozhenie. S. S22–S26. (in Russian)]  
<https://doi.org/10.1134/S0016675818130118>
  121. 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 external gamma radiation // Biol. Bull. 2019. № 11. P. 1563–1569 (in Russian)  
<https://doi.org/10.1134/S1062359019110062>
  122. de Vocht F., Suderman M., Ruano-Ravina A. et al. Residential exposure to radon and DNA methylation across the lifecourse: an exploratory study in the ALSPAC birth cohort // Wellcome Open Res. 2019. V. 4. P. 3.  
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14991.2>
  123. Koturbash I., Zemp F., Kolb B., Kovalchuk O. Sex-specific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model // Mutat. Res. 2011. V. 722. № 2. P. 114–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.05.007>
  124. Wang Y., Scheiber M.N., Neumann C. et al. MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2011. V. 81. № 3. P. 839–848.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.09.048>
  125. Koturbash I., Loree J., Kutanzi K. et al. O. In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. V.70. № 2. P. 554–562.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.09.039>
  126. Cuzzo C., Porcellini A., Angrisano T. et al. DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation // PLoS Genet. 2007. V. 3. № 7. e110.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030110>
  127. Morano A., Angrisano T., Russo G. et al. Targeted DNA methylation by homology-directed repair in mammalian cells. Transcription reshapes methylation on the repaired gene // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 2. P. 804–821.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt920>
  128. Maltseva D.V., Gromova E.S. Interaction of murine dnmt3a with DNA containing o6-methylguanine // Biochemistry. 2010. V. 75. № 2. P. 173–81 (in Russian)  
<https://doi.org/10.1134/s0006297910020070>
  129. Mortusewicz O., Schermelleh L., Walter J., Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 25. P. 8905–8909.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501034102>
  130. Feng J., Zhou Y., Campbell S.L. et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons // Nat. Neurosci. 2010. V. 13. № 4. P. 423–430.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2514>
  131. Mistry H., Tamblyn L., Butt H. et al. UHRF1 is a genome caretaker that facilitates the DNA damage response to gamma-irradiation // Genome Integr. 2010. V. 1. № 1. P. 7.  
<https://doi.org/10.1186/2041-9414-1-7>
  132. Mudbhary R., Hoshida Y., Chernyavskaya Y. et al. UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma // Cancer Cell. 2014. V. 25. № 2. P. 196–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.003>
  133. Luzhna L., Ilynskyy Ya., Kovalchuk O. Mobilization of LINE-1 in irradiated mammary gland tissue may potentially contribute to low dose radiation-induced genomic instability // Genes Cancer. 2015. V. 6. № 1–2. P. 71–81.  
<https://doi.org/10.18632/genesandcancer.50>
  134. Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A., Agirre X. et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia // Oncogene. 2005. V. 24. № 48. P. 7213–7223.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208866>
  135. Morse B., Rotherg P.G., South V.J. et al. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma // Nature. 1988. V. 333. № 6168. P. 87–90.  
<https://doi.org/10.1038/333087a0>
  136. Farkash E.A., Kao G.D., Horman S.R., Luning Prak E.T. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. № 4. P. 1196–1204.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkj522>
  137. Apornewan C., Phokaew C., Piriyaopongsa J. et al. Hypomethylation of Intragenic LINE-1 Represses Transcription in Cancer Cells through AGO2 // PLoS One. 2011. V. 6. № 3. e17934.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017934>
  138. Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J. et al. Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs // PLoS Genetics. 2013. V. 9. № 4. e1003470.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>

139. Gim J., Ha H., Ahn K. et al. Genome-wide identification and classification of micro RNAs derived from repetitive elements // *Genomics Inform.* 2014. V. 12. № 4. P. 261–267.  
<https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.4.261>
140. Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A. et al. Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation? // *Mutat. Res.* 2003. V. 529. № 1–2. P. 13–20.  
[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(03\)00103-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(03)00103-9)
141. Georgieva M., Rashydov N.M., Hajduch M. DNA damage, repair monitoring and epigenetic DNA methylation changes in seedlings of Chernobyl soybeans // *DNA repair.* 2017. V. 50. P. 14–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.12.002>
142. Volkova P.Yu., Geras'kin S.A., Horemans N. et al. Chronic radiation exposure as an ecological factor: Hypermethylation and genetic differentiation in irradiated Scots pine populations // *Environ. Pollut.* 2018. V. 232. P. 105–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.123>
143. Ye S., Yuan D., Xie Y. et al. Role of DNA methylation in long-term low-dose gamma-rays induced adaptive response in human B lymphoblast cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2013. V. 89. № 11. P. 898–906.  
<https://doi.org/10.3109/09553002.2013.806832>
144. Ding N., Bonham E.M., Hannon B.E. et al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage // *J. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 8. № 3. P. 244–254.  
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv050>
145. O'Hagan H.M. Chromatin modifications during repair of environmental exposure-induced DNA damage: a potential mechanism for stable epigenetic alterations // *Environ. Mol. Mutagen.* 2014. V. 55. № 3. P. 278–291.  
<https://doi.org/10.1002/em.21830>
146. O'Hagan H.M., Mohammad H.P., Baylin S.B. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 8. e1000155.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000155>
147. O'Hagan H.M., Wang W., Sen S. et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands // *Cancer Cell.* 2011. V. 20. № 5. P. 606–619.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.012>
148. Lorat Y., Timm S., Jakob B. et al. Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation // *Radiother. Oncol.* 2016. V. 121. № 1. P. 154–161.  
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.08.028>
149. Kongruttanachok N., Phuangphairoj C., Thongnak A. et al. Replication independent DNA double-strand break retention may prevent genomic instability // *Mol. Cancer.* 2010. V. 9. P. 70.  
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-70>
150. Pornthanakasem W., Kongruttanachok N., Phuangphairoj C. et al. LINE-1 methylation status of endogenous DNA double-strand breaks // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № P. 3667–3675.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn261>
151. Kane A.E., Sinclair D.A. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2019. V. 54. № 1. P. 61–83.  
<https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1570075>
152. Cecco M., De Criscione S.W., Peterson A.L. et al. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues // *Aging.* 2013. V. 5. № 12. P. 867–883.  
<https://doi.org/10.18632/aging.100621>
153. Booth L., Brunet A. The aging epigenome // *Mol Cell.* 2016. V. 62. № 5. P. 728–744.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.013>
154. Webb A.E., Kundaje A., Brunet A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution // *Aging Cell.* 2016. V. 15. № 4. P. 673–685.  
<https://doi.org/10.1111/acel.12479>
155. Zhang Y., Smith C.L., Saha A. et al. DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC // *Mol. Cell.* 2006. V. 24. № 4. P. 559–568.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.025>
156. Lake R.J., Boetefuer E.L., Won K., Fan H. The CSB chromatin remodeler and CTCF architectural protein cooperate in response to oxidative stress // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 5. P. 2125–2135.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1219>
157. Lu T., Aron L., Zullo J. et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's Disease // *Nature.* 2014. V. 507. № 7493. P. 448–454.  
<https://doi.org/10.1038/nature13163>
158. Anckar J., Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 1089–1115.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>
159. Gritsenko D.A., Orlova O.A., Linkova N.S., Khavinson V.K. Transcription factor p53 and skin aging // *Adv. Gerontol.* 2017. V. 30. № 1. P. 10–16.
160. Maegawa S., Hinkal G., Kim H.S. et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 3. P. 332–340.  
<https://doi.org/10.1101/gr.096826.109>
161. Teschendorff A.E., Menon U., Gentry-Maharaj A. et al. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 4. P. 440–446.  
<https://doi.org/10.1101/gr.103606.109>
162. Bocker M.T., Hellwig I., Breiling A. et al. Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging // *Blood.* 2011. V. 117. № 19. P. 182–190.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331926>
163. Raddatz G., Hagemann S., Aran D. et al. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the

- human epidermis // Epigenet. Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 36.  
<https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-36>
164. Mcclay J.L., Aberg K.A., Clark S.L. et al. A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects // Hum. Mol. Genet. 2014. V. 23. № 5. P. 1175–1185.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt511>
165. Lund J.B., Li S., Baumbach J. et al. DNA methylome profiling of all-cause mortality in comparison with age-associated methylation patterns // Clin. Epigenet. 2019. V. 11. P. 23.  
<https://doi.org/10.1186/s13148-019-0622-4>

## Radiation-induced DNA Methylation Changes: *in vitro* and *in vivo* Studies

N. S. Kuzmina<sup>#</sup>

*N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>#</sup>*E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru*

The phenomenological aspects and mechanisms of DNA methylation disorders (changes in the total level of DNA methylation and in repetitive elements methylation, locus-specific methylation disorders, loss of imprinting) induced by radiation in experimental studies *in vitro* and *in vivo*, as well as in the human body are considered. The results of evaluation of relationship between the radiosensitivity of tumor cells and their epigenetic status are demonstrated. Although it has been established that the radioresistant phenotype of such cells is associated with hypermethylation of promoters of multiple genes, the mechanism of this phenomenon is very complex and a targeted impact on methylation to increase the level of damages in tumor cells leading to their death is required. The association of induced changes in DNA methylation with manifestations of such untargeted radiation effects as genomic instability and the “bystander” effect was revealed. The potential significance of the study of changes in DNA methylation in irradiated subjects in order to identify individuals with premature aging and an increased risk of age-associated pathology is discussed.

**Keywords:** radiation, *in vitro* and *in vivo* studies, DNA hyper-/hypomethylation, CpG-island, premature aging

РАДИАЦИОННАЯ  
ГЕНЕТИКА

УДК 575.224:595.773:57.084.1:539.164:539.1.047

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ  $\alpha$ -ИЗЛУЧЕНИЯ  
В ТЕСТ-СИСТЕМАХ *Drosophila melanogaster*© 2020 г. З. М. Бияшева<sup>1,\*</sup>, М. Ж. Глеубергенова<sup>1</sup>, Ю. А. Зарипова<sup>1</sup>,  
В. В. Дьячков<sup>1</sup>, С. Ж. Колумбаева<sup>1</sup><sup>1</sup> Казахский национальный университет имени аль-Фараби,  
Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Алматы, Казахстан

\*E-mail: zaremabiya@gmail.com

Поступила в редакцию 26.07.2019 г.

После доработки 12.10.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Радон является естественным радиоактивным газом без цвета и запаха, а дочерние продукты его распада (ДПР) являются радиоизотопами – источниками  $\alpha$ -излучения в окружающей среде. Вдоль короткого пути  $\alpha$ -частицы генерируют большое число ионов, т.е. обладают высокой ионизирующей способностью, что обуславливает относительно высокую биологическую активность этого излучения, в 10 раз превышающую таковую для  $\beta$ - и  $\gamma$ -радиации. В связи с этим нами были проведены исследования генотоксических эффектов  $\alpha$ -излучения с использованием разных тест-систем на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*: Меллер-5 (Basc), спаянных (сцепленных) X-хромосомом и сцепленных XY-хромосомом. Долгоживущий изотоп радона – <sup>222</sup>Rn имеет основную  $\alpha$ -линию с энергией 5.5 МэВ, а создавать достаточно интенсивные и направленные пучки  $\alpha$ -излучения этого радионуклида технически затруднительно. Поэтому для моделирующих экспериментов был выбран изотоп <sup>238</sup>Pu, имеющий необходимую  $\alpha$ -линию при распаде, равную 5.5 МэВ. В первом и втором поколениях наблюдали следующие морфологические нарушения: различные морфозы крыльев (асимметрия, отсутствие крыла), глаз, тела, торакса, антенн, образование меланом на разных участках тела, которые проявлялись вплоть до F<sub>3</sub> и исчезали в F<sub>4</sub>. Эти выявленные эффекты указывают на генотоксическую и канцерогенную активность радона и его дочерних продуктов распада. Полученные данные свидетельствуют о том, что  $\alpha$ -излучение, использованное в эксперименте для моделирования ситуации на радоноопасных территориях, обладает генотоксическим влиянием, проявляющимся, в основном, в формировании морфозов или уродств.

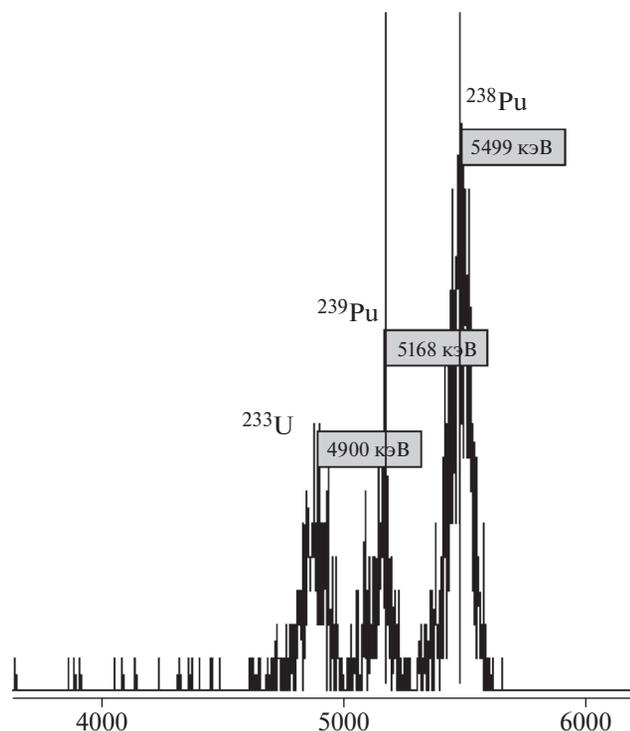
**Ключевые слова:** морфозы, радон,  $\alpha$ -излучение, дрозофила, генотоксичность**DOI:** 10.31857/S0869803120040037

Казахстан занимает второе место в мире по запасам урана, что составляет примерно 12% мировых запасов урана [1]. Естественно, богатые залежи урана обеспечивают высокий радиационный фон, который в регионах Казахстана весьма разнообразен и составляет в среднем 3.2 мЗв/год [2].

При распаде урана образуется инертный радиоактивный газ – радон. Изотопы радона обладают весьма коротким периодом полураспада, однако на их долю приходится 2.12 мЗв/год от средней суммарной дозы облучения человека [3]. Радон является источником  $\alpha$ -излучения, представляющего собой поток положительно заряженных ядер гелия. Из-за относительно крупных размеров  $\alpha$ -частицы обладают малой проникающей способностью, но имеют наибольшую плотность ионизации, поэтому для этого излучения типична более высокая относительная биологическая эффективность в отличие от таковой для

$\beta$ - и  $\gamma$ -радиации [4]. Попадая в организм,  $\alpha$ -частицы могут вызывать микроожоги, повреждать клетки, генетический материал и стать причиной появления раковых клеток.

По данным Научного комитета по действию атомной радиации (НКДАР) ООН, радон является причиной около 20% всех заболеваний раком легких в мире. Воздействие радона считается первой причиной рака легких у никогда не курящих [5]. Кроме того, этот газ может усиливать эффекты воздействия других факторов, таких как сигаретный дым, пыль и выхлопные газы. Табачный дым увеличивает онкогенный эффект радона в 2–10 раз, и, что наиболее важно, радон значительно снижает латентный период при раке легкого [6, 7]. Исследования, проведенные Агентством по охране окружающей среды США, показали, что связанные с радоном заболевания рака легких у ку-



**Рис. 1.** Спектр  $\alpha$ -источника, используемого в экспериментах (полученный на  $\alpha$ -спектрометре “МУЛЬТИРАД-АС” с полупроводниковым детектором).

**Fig. 1.**  $\alpha$ -Source spectrum used in the experiments (obtained on the  $\alpha$ -spectrometer “MULTIRAD-AS” with a semiconductor detector).

рящих в 3 раза выше, чем у некурящих из той же группы населения [8].

Радон высвобождается из земной коры повсеместно, его концентрация существенно различается для различных точек земного шара. Алма́тинская область ввиду наличия большого количества тектонических разломов, усиливающих эманацию радона, может быть отнесена к радоноопасным территориям. В связи с этим нами были проведены исследования генотоксических эффектов  $\alpha$ -излучения с использованием разных тест-систем на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

С целью изучения генетических последствий, возникающих в тест-системах дрозофил при воздействии  $\alpha$ -излучения изотопов радона, планировали использовать долгоживущий изотоп радона —  $^{222}\text{Rn}$ , который генерирует основную  $\alpha$ -линию с энергией 5.5 МэВ. Однако создать достаточно интенсивные и направленные пучки  $\alpha$ -излучения радона оказалось технически затруднительно. Поэтому для моделирующих экспериментов был

выбран изотоп  $^{238}\text{Pu}$ , имеющий необходимую  $\alpha$ -линию, при распаде равную 5.5 МэВ (рис. 1).

Использовали изотоп  $^{238}\text{Pu}$  в стальных образцах спектрометрических источников с активностью радионуклида в источнике  $4.01 \times 10^4$  Бк, периодом полураспада  $3.205 \times 10^4$  дней и потоком  $\alpha$ -частиц через рабочую поверхность источника в телесный угол  $2\pi - 1.99 \times 10^4$  ср/с.

Такой источник генерирует  $\alpha$ -частицы, которые вдоль короткого пути создают большое число ионов, т.е. обуславливают большую линейную плотность ионизации. Это обеспечивает выраженную относительную биологическую эффективность, в 10 раз большую, чем таковая для рентгеновского и  $\gamma$ -излучений. Поэтому  $\alpha$ -частицы могут вызвать тяжелые последствия при непосредственном попадании в организм человека. В тканях и клетках живых организмов образуются свободные радикалы. Радиоактивные изотопы фактически не выводятся из организма самостоятельно, поэтому они будут накапливаться и облучать ткани изнутри на протяжении многих лет, пока не приведет к серьезным изменениям [9]. Организм человека не способен нейтрализовать, переработать, усвоить или утилизировать, большинство радиоактивных изотопов, попавших внутрь организма [10].

Для оценки генотоксической активности  $\alpha$ -излучения использовали традиционные тест-системы Меллер-5 (Vasc), спаянных (сцепленных) X-хромосом и сцепленных XY-хромосом *Drosophila melanogaster*.

Метод Меллер-5 (Vasc) позволяет выявить мутации в X-хромосоме, приводящие к летальным исходам и морфологическим аномалиям во втором поколении. Схема опыта была разработана Г. Мёллерем. Им была синтезирована линия Vasc с двумя инверсиями —  $sc^8$  и  $sc^{49}$  ( $\delta 49$ ), которые препятствуют кроссинговеру между половыми хромосомами. Инверсия  $sc^8$  захватывает большую часть X-хромосомы. Поскольку в длинных инверсиях перекрест все же происходит, в инверсию  $sc^8$  введена другая, более короткая инверсия,  $\delta 49$ , которая подавляет перекрест в средней области X-хромосомы. Порядок генов в хромосоме  $sc^8 \delta 49$  нарушен дважды, и поэтому перекрест в ней полностью исключен. Обе инверсии не связаны с рецессивным летальным действием, и гомозиготные по хромосоме Меллер-5 самки и такие же гемизиготные самцы жизнеспособны [11]. Фенотипическими маркерами служат рецессивная мутация  $w^a$  — абрикосовые глаза и полудоминантная мутация *Bar* — полосковидные глаза.

В качестве второй тест-системы использовали спаянные, или сцепленные, X-хромосомы, что позволяет обнаружить видимые рецессивные, сцепленные с полом мутации в первом поколе-

нии у самцов [12]. Метод основан на том, что сцепленные X-хромосомы всегда передаются вместе, так как они соединены по центромере. У самок со сцепленными X-хромосомами в генотипе присутствует также Y-хромосома, которую они получают от отца. При скрещивании таких самок ( $\widehat{XXY}$ ) с нормальными самцами (XY) в следующем поколении рождаются самки ( $\widehat{XXY}$ ) и самцы, получающие одну X-хромосому от отцовской особи, а Y-хромосому от материнской [13]. В эксперименте использовали самок дрозофилы линии 1-112. Фенотипическими маркерами были гены *y* (*yellow*) – желтое тело, *w* – белые глаза, *f* (*forked*) – короткие вильчатые щетинки.

В третьей тест-системе использовали генетическую линию ЭП-2, которая имеет сцепленные X-хромосомы и XY-хромосомы. Фенотипическими маркерами линии ЭП-2 являются гены *y* (*yellow*) – желтое тело, *v* (*vermillion*) – алые глаза у самок. Линии 1-112 и ЭП-2 были синтезированы в Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН (г. Новосибирск) и любезно нам представлены.

Таким образом, в эксперименте использовали тест-системы Меллер-5, 1-112 и ЭП-2. Самцов дрозофилы подвергали воздействию  $\alpha$ -излучения на смонтированной установке из стекла (рис. 2). Виргинных самок этих линий скрещивали с облученными самцами дикого типа (линия Oregon).

На дно стеклянных кюветов заливали питательную среду, приготовленную по общепринятой методике, толщиной 1 мм [14]. В каждую кювету помещали до 50 имаго дрозофилы. Одна кювета не облучалась и являлась контрольной, на вторую кювету накладывали источник – изотоп  $^{238}\text{Pu}$  (стальные образцы спектрометрических источников  $\alpha$ -излучения). Общий размер источника составляет  $24.0 \pm 0.2$  мм, диаметр полированной части  $16 \pm 2$  мм. Источник находился непосредственно сверху исследуемого образца, чтобы он весь подвергался воздействию  $\alpha$ -излучения.

Перед началом эксперимента исходные тестерные генетические линии плодовых мушек дрозофилы были проверены цитологически на наличие инверсий и сцепленных половых хромосом на временных препаратах политенных хромосом слюнных желез дрозофил.

Культивирование мух, отбор и скрещивание проводились при температуре  $23\text{--}25^\circ\text{C}$ , которая является наиболее оптимальной температурой для развития *Drosophila melanogaster*. Самцов подвергали воздействию  $\alpha$ -излучения в течение 24 ч. Поглощенная доза с учетом взвешенного коэффициента по  $\alpha$ -излучению ( $W\alpha \equiv 20$ ), которая может влиять на гормональный статус особи, составляла около  $400\text{--}500$  мГр [15]. Использовали

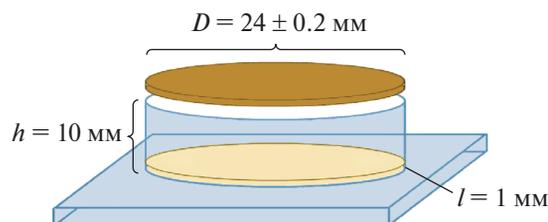


Рис. 2. Установка для воздействия  $\alpha$ -излучением на имаго дрозофилы ( $D$  – диаметр стального образца спектрометрического источника  $\alpha$ -излучения;  $h$  – высота кюветы;  $l$  – толщина питательной среды).

Fig. 2. Installation for  $\alpha$ -radiation exposure on drosophila imago ( $D$  – the diameter of the steel spectrometric  $\alpha$ -radiation source sample;  $h$  – the cuvette height;  $l$  – the nutrient medium thickness).

самок и самцов не старше 5 дней, во избежание увеличения возрастного уровня мутирования.

В тест-системе Меллер-5 (Vasc) скрещивания проводили по следующей схеме (рис. 3) [11]. В тест-системах ЭП-2 и 1-112 скрещивание проводили согласно схемам на рис. 4.

Каждая пробирка второго поколения ( $F_2$ ) в тест-системе Меллер-5 и первого поколения ( $F_1$ ) в тест-системах сцепленных половых хромосом (1-112 и ЭП-2) подвергалась визуальному анализу после полного вылета генерации для выявления мутаций. Визуальный анализ сопровождался подсчетом количества мух без мутаций –  $a$ ,  $c$ , и с условными мутациями (морфозами) –  $b$ ,  $d$ .

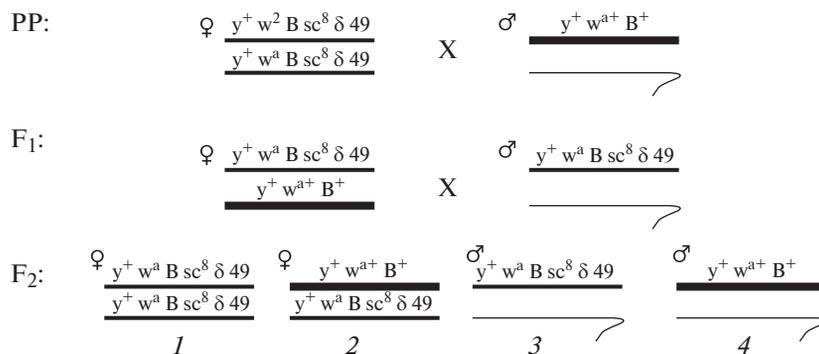
Сравнение результатов в опыте и контроле проводили по методу  $\chi^2$  с поправкой Йейтса [16]. Расчеты были выполнены по формуле:

$$\chi^2 = \frac{\left(|ad - bc| \frac{N}{2}\right)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)},$$

где  $a$ ,  $c$  – мухи без мутаций в опыте;  $b$ ,  $d$  – мухи с мутациями в опыте;  $N$  – общее число мух.

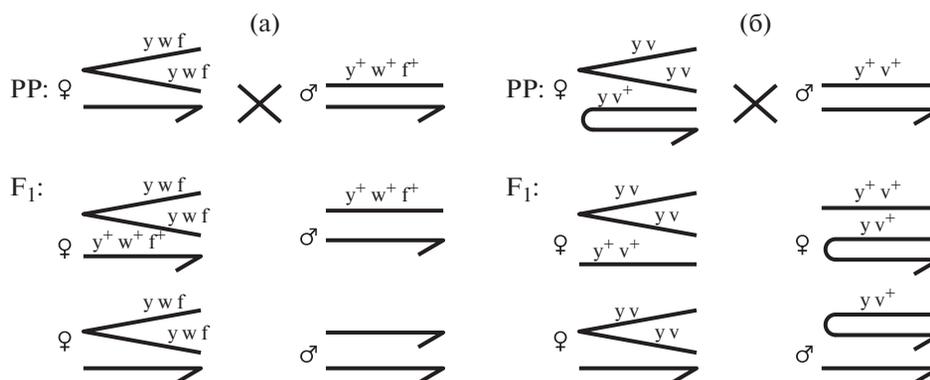
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В тест-системах со сцепленными половыми хромосомами были обнаружены только морфозы. В тест-системе М-5, помимо морфозов, были выявлены мутации нивелирования фертильности самцов, но для достоверного сравнения генотоксичности в разных тест-системах во внимание брали только морфозы. Образование морфозов – одно из проявлений условных мутаций, которые не связаны с первичной структурой ДНК и возникают в регуляторных генах, ответственных за образование признаков внутривидового сходства [17]. Морфозы – это ненаследственные морфологические нарушения (уродства), которые образуются в результате воздействия на организм стрессовых



**Рис. 3.** Схема скрещиваний по методу Меллер-5 для обнаружения мутаций в X-хромосоме, приводящих к летальным исходам и морфологическим аномалиям в F<sub>2</sub>: 1 – самки Меллер-5; 2 – самки с серым телом, узкими абрикосового цвета глазами, гетерозиготные по вновь возникшей летальной мутации в X-хромосоме; 3 – серые самцы с узкими абрикосового цвета глазами; 4 – самцы дикого типа, при наличии летальной мутаций в X-хромосоме не развиваются. Жирной линией обозначена облученная X-хромосома.

**Fig. 3.** Scheme of crosses by the Muller-5 method for revealing lethal and morphological mutations in X-chromosome F<sub>2</sub>: 1 – Muller-5 females; 2 – females with a gray body, narrow apricot eyes, heterozygote by inducing lethal mutations in X-chromosome; 3 – gray males with narrow apricot eyes; 4 – wild type males with a lethal mutation in X-chromosome are not develop. The bold line indicates the irradiated X-chromosome.



**Рис. 4.** Схема генетического скрещивания самок 1-112 (а) и ЭП-2 (б), содержащих сцепленные X-хромосомы и сцепленные XY-хромосомы с самцами линии Oregon.

**Fig. 4.** Scheme of females genetic crossing 1-112 (a) and PE-2 (b) containing linked X-chromosomes and linked XY-chromosomes with Oregon males.

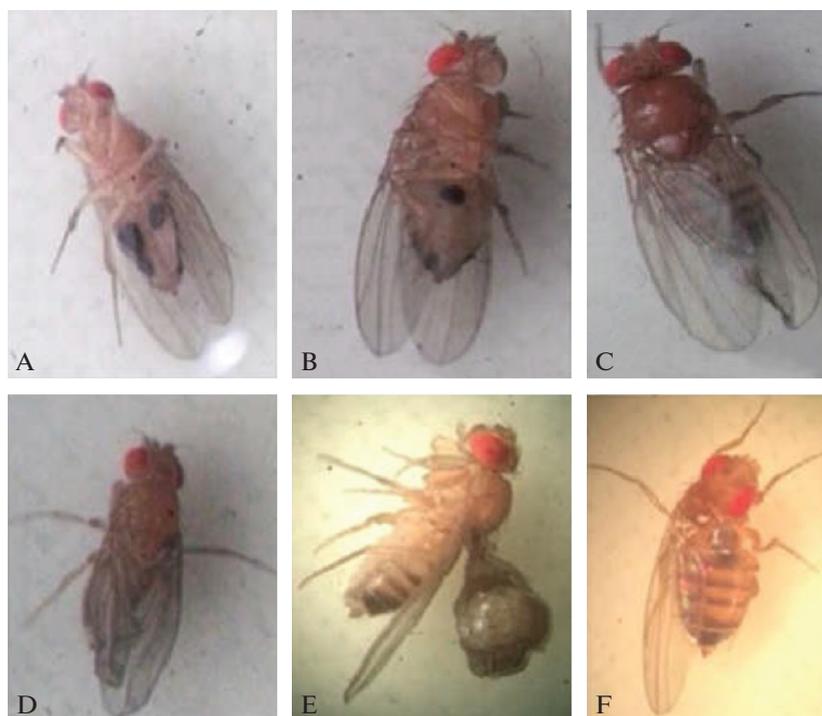
факторов внешней среды [18]. В нашем случае стрессовым фактором являлось  $\alpha$ -излучение.

В результате анализа F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> были выявлены следующие морфологические нарушения: различные морфозы крыльев (асимметрии, отсутствие крыла), глаз, тела, торакса, антенн, образование меланом на разных участках тела (рис. 5–7).

Эти морфологические изменения указывают на генотоксическую и канцерогенную активность радона и его ДПР.

В тест-системах 1-112 и ЭП-2 было обнаружено большее относительное количество морфозов, чем в тест-системе Васк. Скорее всего, это связано с наблюдаемым в системах сцепленных половых хромосом эффектом положения генов. Данное явление было открыто А. Стёртевантом еще в

1925 г. [19], а в 1935 г. Н.П. Дубинин и Б.Н. Сидоров заметили, что при эффекте положения ген не теряется, а изменяется лишь его состояние [20]. С эффектом положения гена связаны и так называемые условные мутации (морфозы), потому что при таких мутациях чаще повреждаются не структурные, а регуляторные элементы генома, ответственные за транскрипцию, репликацию, компактизацию и другие важные процессы регуляции и реализации генетической информации [17]. Эффект положения проявляется в инактивации гена при перемещении его из эухроматиновых областей в гетерохроматиновые. У дрозофилы с развитием происходит изменение положения гетерохроматиновых областей, т.е. в процессе онтогенеза происходит активация одних районов хромосомы и инактивация других. Наличие сцеплен-



**Рис. 5.** Обнаруженные морфозы и новообразования у мух *F<sub>2</sub> Drosophila melanogaster* в тест-системе Меллер-5: А и В – черные пятна на теле (меланома); С – изменение формы крыльев; D – скрученные крылья с неправильным жилкованием; E – образование пузыря вместо одного крыла; F – сочетание нескольких морфозов: отсутствие крыла, деформация торакса, брюшка, щитка.

**Fig. 5.** Morphoses detected in flies *F<sub>2</sub> Drosophila melanogaster* in the Muller-5 test-system: A and B – black spots on the body (melanoma); C – changing the wings shape; D – twisted wings with irregular venation; E – the bubble formation instead of a single wing; F – combination of several morphoses: wing absence, deformation of the thorax, abdomen, shield.

ных половых хромосом у линий 1-112 и ЭП-2 усиливает проявление эффекта положения [21].

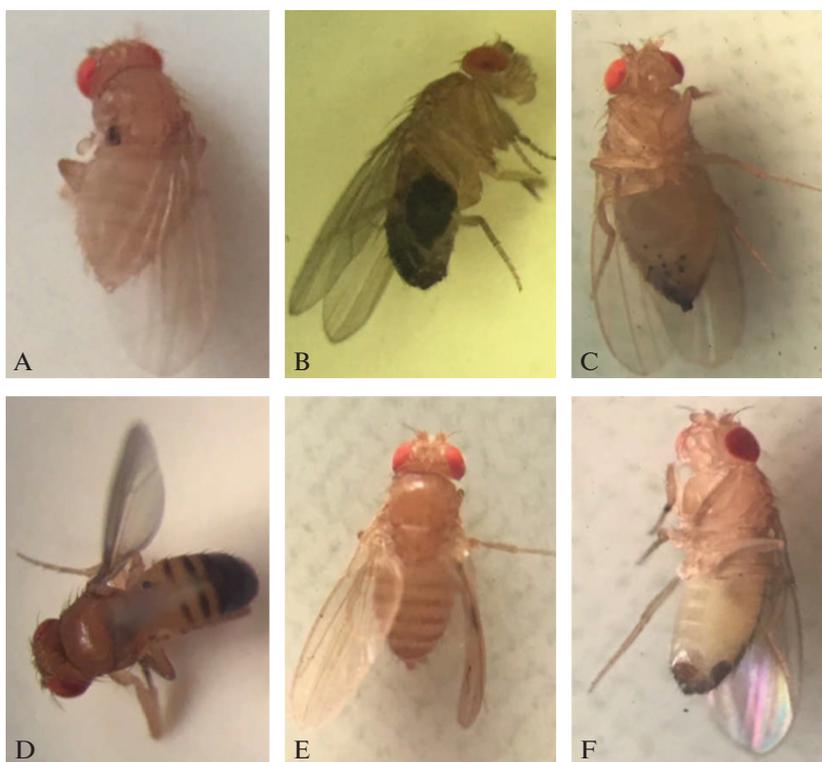
Анализ имаго с морфозами показал, что последние практически не влияют на жизнедеятельность мух: не снижают выживаемость, способность спариваться и продуцировать генерации. У потомков облученных мух в  $F_2$  и до  $F_4$  можно наблюдать уродства (морфозы) различной степени выраженности, не влияющие на жизнеспособность и размножение мух. При обычных условиях культивирования дрозофил в отсутствие стрессовых факторов экспериментаторы также могут встретиться со случаями образования морфозов, но подобное происходит крайне редко [22].

Как видно из рисунков, морфозы могут затрагивать любую часть тела, либо одновременно несколько частей. В классификации морфозов можно выделить два основных типа: “ткань+” и “ткань–” [23]. “Ткань+” – это различные новообразования тканей: темные пятна (или меланомы), похожие на некротические пятна, пузыри на крыльях и на брюшке. “Ткань–” – это отсутствие части ткани или органов: отсутствие крыла, фасеток глаза или целого глаза, отсутствие ноги. Как

отмечают исследователи и наблюдалось в наших экспериментах, общими чертами морфозов являются асимметричность и доминантный характер проявления [24]. Возникновение морфозов не зависело от пола мух, что объясняется нарушением работы регуляторных генов аутосомных хромосом, в результате чего происходило изменение фенотипа мутантов. Кроме того, в следующих поколениях ( $F_2$  и  $F_4$ ) типы морфозов не наследовались, так как не все морфозы меланомы  $F_1$  становились морфозами крыльев, и наоборот.

Обобщенные результаты (количество мух без мутаций и с условными мутациями, т.е. с морфозами) и итоги статистического анализа представлены в табл. 1.

Статистическая обработка данных эксперимента в опыте Меллер-5 (Basc), в тест-системе сцепленных X-хромосом и сцепленных XY-хромосом с использованием источника  $\alpha$ -излучения ( $^{238}\text{Pu}$ ) показала, что  $\alpha$ -излучение обладает генотоксическим эффектом, и наиболее чувствительной является тест-система сцепленных XY-хромосом (линия ЭП-2), что связано с более выра-



**Рис. 6.** Обнаруженные морфозы и новообразования у мух  $F_1$  *Drosophila melanogaster* в тест-системе ЭП-2: А – отсутствие одного крыла и меланома; В – меланома на правой стороне брюшка; С – черные пятнышки на брюшке; D – пятно на тораксе; Е – нарушение жилкования крыла и асимметрия; F – пятно на брюшке.

**Fig. 6.** Morphoses detected in flies  $F_1$  *Drosophila melanogaster* in the PE-2 test-system: A – wing absence and melanoma; B – melanoma on the abdomen right side; C – black spots on the abdomen; D – spot on the thorax; E – violation of wing venation and asymmetry; F – spot on the abdomen.

женным эффектом положения генов из-за дополнительной Y-хромосомы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из главных задач экологической генетики является разработка адекватных тест-систем

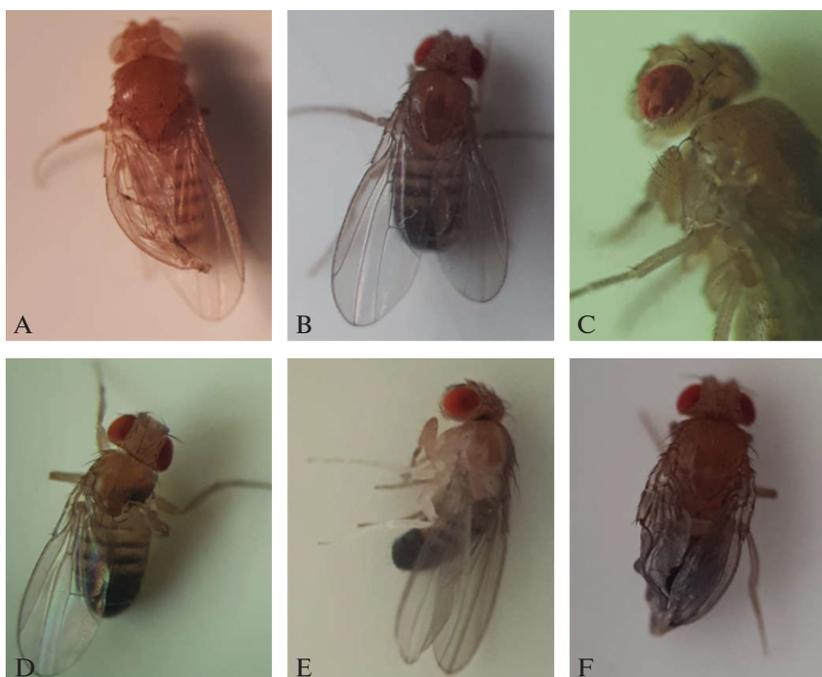
для оценки генетической опасности факторов окружающей среды. В качестве основного критерия, позволяющего оценить генотоксический эффект  $\alpha$ -излучения на дрозофиле, нами были выбраны условные мутации, проявляющиеся как морфозы. Классическая генетика построена на изучении мутаций с автономным проявлением, в

**Таблица 1.** Количество мутантных особей *Drosophila melanogaster* (результаты опыта с воздействием  $\alpha$ -излучения и контроль)\*

**Table 1.** The results of experiment and control

Тест-система	Меллер-5 (Basc)			ЭП-2			1-112		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Sigma$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Sigma$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Sigma$
Опыт ( $Pu^{238}$ )	3820	28**	3848	1797	38***	1835	3269	60**	3329
	<i>c</i>	<i>d</i>		<i>c</i>	<i>d</i>		<i>c</i>	<i>d</i>	
Контроль (без облучения)	3690	10	3700	1778	7	1785	1364	6	1370
	$\Sigma$	7510	38	<b>7548</b>	3575	45	<b>3620</b>	4633	<b>4699</b>

Примечание. \*Количество мух без мутаций – *a*, *c*, и с условными мутациями (морфозами) – *b*, *d*; \*\*статистически значимые отличия от контроля,  $p < 0.05$ ; \*\*\*статистически значимые отличия от контроля,  $p < 0.001$ .



**Рис. 7.** Обнаруженные морфозы у мух  $F_1$  *Drosophila melanogaster* в тест-системе 1-112: А – скрученное крыло; В – короткое правое крыло; С – нарушение фасеток глаза; D – отсутствие одного крыла; Е – изменение окраски торакса и ног, или “остекленение”; F – скрученные оплавленные крылья.

**Fig. 7.** Morphoses detected in flies  $F_1$  *Drosophila melanogaster* in the 1-112 test-system: A – twisted wing; B – short right wing; C – violation of eye facets; D – wing absence; E – thorax and legs discoloration, or “glazing”; F – twisted fused wings.

то время как мутации с неавтономным проявлением формируют особые “признаки”, в основном это модификации и морфозы, затрагивающие инвариантную часть видового облика организма.

Выявлено статистически значимое повышение частоты морфозов как результат наличия условных мутаций, индуцированных в X-хромосоме самцов *Drosophila melanogaster* линии Oregon при воздействии  $\alpha$ -излучения, по сравнению с таковым показателем в контроле. Используемый нами непараметрический критерий  $\chi^2$  продемонстрировал различия в распределении частот наблюдаемых аномалий в эксперименте и контроле ( $p < 0.05$ ). Таким образом, в экспериментальном исследовании с воздействием  $\alpha$ -излучения на *Drosophila melanogaster* (линия Oregon) продемонстрирована генотоксическая активность  $\alpha$ -частиц.

В этом исследовании также изучены генотоксические эффекты  $\alpha$ -излучения (радон и его продукты распада) на развитие *Drosophila melanogaster* в нескольких тест-системах: Меллер-5, сцепленных X-хромосом (1-112) и сцепленных XY-хромосом (ЭП-2). В данном опыте морфозы у мушек дрозофилы первого и второго поколений выглядели как черные пятна, или меланомы на различных частях тела имаго; “генерализованные” меланомы; закрученные, изогнутые крылья; нару-

шение жилкования крыльев; укороченное крыло; пузырь на одном крыле; отсутствие одного крыла, деформация торакса, нарушение распределения глазных фасеток и волосков; отсутствие пигментации второй и третьей ног. Морфозы проявлялись в  $F_1$ – $F_3$  генерациях и исчезали в  $F_4$ .

Выявлены статистически значимые различия (метод  $\chi^2$ ) между экспериментом и контролем. Таким образом, можно считать, что  $\alpha$ -частицы, источником которых в окружающей среде, в основном, является радон и его изотопы, характеризуются генотоксическим действием, проявляющимся, как правило, в формировании морфозов или уродств. Необходимы дополнительные исследования для оценки дозовой зависимости индукции  $\alpha$ -излучением рассматриваемых аномалий.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке государственного грантового финансирования фундаментальных исследований Республики Казахстан (проекты ИРН AP05133577 и ИРН AP05131884).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bersimbaev R., Bulgakova O.* The health effects of radon and uranium on the population of Kazakhstan // *Genes Environ.* 2015. V. 37. P. 18.  
<https://doi.org/10.1186/s41021-015-0019-3>
2. *Хусаинов А.Т., Скипин Л.Н., Софронова Л.И.* Проблемы обеспечения радиационной безопасности в уранодобывающих регионах Северного Казахстана // *Вестник Тюм. ГУ.* 2011. № 4. С. 91–94. [*Husainov A.T., Skipin L.N., Sofronova L.I.* Influence of waste uranium companies on ecosystems of North Kazakhstan // *Vestnik Tyum. GU.* 2011. № 4. P. 91–94. (in Russian)]
3. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources, effects and risks of ionizing radiation. UNSCEAR 2012 report to the general Assembly with scientific annexes. New York: United Nations, 2015. 320 p.
4. *Karam P.A., Stein B.P.* Radioactivity. New York: Chelsea House, 2009. 128 p.
5. *Torres-Durán M., Ruano-Ravina A., Parente-Lamelas I. et al.* Lung cancer in never-smokers: a case–control study in a radon-prone area (Galicia, Spain) // *Eur. Respir. J.* 2014. V. 44. № 4. P. 850–852.  
<https://doi.org/10.1183/09031936.00017114>
6. *Méndez D., Alsharqety O., Warner K.E. et al.* The Impact of Declining Smoking on Radon-Related Lung Cancer in the United States // *Am. J. Public. Health.* 2011. V. 101. № 2. P. 310–14.  
<https://doi.org/10.2105/AJPH.2009.189225>
7. *Chahine T., Schultz B.D., Zartarian V.G. et al.* Modeling Joint Exposures and Health Outcomes for Cumulative Risk Assessment: The Case of Radon and Smoking // *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2011. V. 8. P. 3688–3711.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph8093688>
8. United States Environmental Protection Agency. EPA Assessment of Risk from Radon in Homes. EPA 402-R-03-003; Office of Air and Radiation. USA, Washington, DC; 2003. 98 p.
9. *Robertson A., Allen J., Laney R. et al.* The Cellular and Molecular Carcinogenic Effects of Radon. Exposure // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 7. P. 14024–14063.  
<https://doi.org/10.3390/ijms140714024>
10. *Kendall G.M., Smith T.J.* Doses to organs and tissues from radon and its decay products // *J. Radiol. Prot.* 2002. V. 22. № 4. P. 389–406.
11. *Медведев Н.Н.* Практическая генетика. М.: Наука, 1968. 294 с. [*Medvedev N.N.* *Prakticheskaya genetika.* M.: Nauka, 1968. 294 p. (In Russian)]
12. *Muller H.J.* The Production of Mutations by X-Rays // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1928. V. 14. № 9. P. 714–726.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.14.9.714>
13. *Жимулев И.Ф.* Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. 497 с. [*Zhimulev I.F.* *Obshchaya i molekulyarnaya genetika.* Novosibirsk: Sibirskoye universitetskoye izdatel'stvo, 2007. 497 p. (In Russian)]
14. *Kohler R.E.* Lords of the fly: *Drosophila* genetics and the experimental life. Chicago: University of Chicago Press, 1994. 321 p.
15. *Moskalev A., Shapovnikov M., Snezhkina A. et al.* Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1. P. e86051. doi.org/  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086051>
16. *Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В. и др.* Биометрия. Л.: ЛГУ, 1982. 264 с. [*Glotov N.V., Zhivotovskiy L.A., Khovanov N.V. et al.* *Biometrics.* Leningrad: Leningrad State University, 1982. 264 p. (In Russian)]
17. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А. и др.* Новый класс мутаций у *Drosophila melanogaster* // Докл. РАН. 2000. Т. 373. № 5. С. 714–717. [*Chadov B.F., Chadova E.V., Kopyl S.A. et al.* A new class of mutations in *Drosophila melanogaster* // *Dokl. Ros. Akad. Nauk.* 2000. V. 373. № 5. P. 423–426. (In Russian)]  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2585.5606>
18. *Chadov B.F.* A new stage in the development of genetics and term epigenetics // *Rus. J. Genetics.* 2006. V. 42. № 9. P. 1053–1065.
19. *Sturtevant A.H.* The effects of unequal crossing over at the Bar locus in *Drosophila* // *Genetics.* 1925. V. 10. № 2. P. 117–147.
20. *Дубинин Н.П., Сидоров Б.Н.* Зависимость действия гена от его положения в системе // Биол. журн. 1934. Т. 3. № 2. С. 304–331. [*Dubinina N.P., Sidorov B.N.* Zavisimost' deystviya gena ot yego polozheniya v sisteme // *Biol. zhurnal.* 1934. V. 3. № 2. P. 304–331. (In Russian)]
21. *Жимулев И.Ф., Беляева Е.С.* Гетерохроматин и эффект положения гена и генетический сайленсинг // *Генетика.* 2003. Т. 39. № 2. С. 187–201. [*Zhimulev I.F., Beliaeva E.S.* Heterochromatin, gene position effect and gene silencing // *Genetika.* 2003. V. 39. № 2. P. 187–201. (In Russian)]
22. *Рапопорт И.А.* Специфические морфозы у *Drosophila melanogaster*, вызванные химическими соединениями // Бюл. эксперим. биол. мед. 1939. № 7. С. 415–417. [*Rapoport I.A.* Spetsificheskiye morfozy u *Drosophila melanogaster*, vyzvannyye khimicheskimi soyedineniyami // *Byul. eksperim. biol. med.* 1939. № 7. P. 415–417. (In Russian)]
23. *Chadov B.F., Fedorova N.B., Chadova E.V. et al.* Conditional mutations in *Drosophila* // *J. Life Sci. (USA).* 2011. V. 5. № 3. P. 224–240.
24. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А. и др.* От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 9. С. 1157–1172. [*Chadov B.F., Chadova E.V., Kopyl S.A. et al.* From genetics of intraspecific differences to genetics of intraspecific similarity // *Rus. J. Genetics.* 2004. V. 40. № 9. P. 1157–1172. (In Russian)]

## Features of Genotoxic Exposure by $\alpha$ -Radiation in *Drosophila melanogaster* Test-systems

Z. M. Biyasheva<sup>a, #</sup>, M. Zh. Tleubergenova<sup>a</sup>, Yu. A. Zaripova<sup>a</sup>, V. V. Dyachkov<sup>a</sup>, and S. Zh. Kolumbaeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Research Institute for Problems of Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>#</sup>E-mail: zaremabiya@gmail.com

Radon is a natural, colorless and odorless radioactive gas, and its daughter decay products (DDP) are radioisotopes and mainly generate  $\alpha$ -radiation into the environment. Alpha particles create a large number of ions along the short path, that is, they have high ionizing activity. A high level of ionization leads to a relatively high biological activity of these particles, 10 times greater than with beta and gamma radiation. In this regard, we have conducted studies of the genotoxic effects of  $\alpha$ -radiation using different test systems on the fruit fly of *Drosophila melanogaster*: Muller-5 (Basc), linked X-chromosomes and linked XY-chromosomes. Radon isotope  $^{222}\text{Rn}$  has the main  $\alpha$ -line with an energy of 5.5 MeV, but it is technically difficult to create fairly intense and directed beams of radon  $\alpha$ -radiation. Therefore, the  $^{238}\text{Pu}$  isotope, which have the necessary  $\alpha$ -line for decay equal to 5.5 MeV, was chosen for the modeling experiments. In the first and second generations, the following morphological disorders were observed: various morphoses of the wings (asymmetry, wing absence), eyes, body, thorax, antennas, melanomas on different parts of the body, which manifested before  $F_3$  and disappeared in  $F_4$ . These morphological changes indicate genotoxic and carcinogenic activity of radon and its daughter decay products. Based on this, it can be assumed that the alpha particles, with the help of which the situation in radon-hazardous territories was modeled, have a genotoxic effect, manifested mainly in the formation of morphoses or deformities.

**Keywords:** morphoses, radon,  $\alpha$ -radiation, drosophila, genotoxicity

## РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК [57+61]:616-006.6:612.591:615.849:539.1.047

### ГИПЕРТЕРМИЯ КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, НЕВОСПРИИМЧИВЫХ К ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМ

© 2020 г. А. В. Хохлова<sup>1</sup>, А. О. Якимова<sup>1</sup>, В. А. Мосина<sup>1</sup>, Е. И. Селиванова<sup>1</sup>, А. Е. Кабаков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –  
филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

\*E-mail: aekabakov@hotmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.

После доработки 10.02.2020 г.

Принята к публикации 12.02.2020 г.

На *in vitro* модели проверялась возможность применения гипертермии для эффективной радиосенсибилизации опухолевых клеток с радио- и химиорезистентным фенотипом. Работа проводилась на клетках линии MCF-7/MDR1, происходящей из карциномы молочной железы человека и демонстрирующей феномен множественной лекарственной устойчивости из-за гиперэкспрессии гена *MDR1*. В сравнительных экспериментах использовали опухолевые клетки материнской линии MCF-7. Клеточные культуры подвергали тепловому стрессу (42–44°C, 30–90 мин), затем воздействию  $\gamma$ -излучения в дозах 2–8 Гр. Цитотоксические эффекты оценивали в МТТ-тесте, а также по интенсивности апоптоза и некроза или падению клоногенности. Транскрипционный стресс-ответ прогретых клеток изучали с помощью ПЦР в реальном времени, определяя накопление мРНК, кодирующих индуцибельные белки теплового шока HSP70 и HSP27. Установлено, что радио- и химиорезистентные клетки MCF-7/MDR1 не обладают повышенной терморезистентностью, и их реакции на тепловой стресс сравнимы с таковыми клеток MCF-7. При этом показано, что гипертермическая предобработка позволяет значительно усилить цитотоксическое действие  $\gamma$ -излучения на клетки MCF-7/MDR1, что доказывает возможность эффективного использования гипертермии для повышения чувствительности к облучению радиорезистентных опухолей, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью и невосприимчивы к химиотерапевтическим радиосенсибилизаторам. Рассматриваются молекулярные механизмы термо-радиосенсибилизации опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** транскрипционный стресс-ответ, белки теплового шока, HSF1, радиорезистентность, MDR1, химиорезистентность, раковые клетки, лучевая терапия

DOI: 10.31857/S0869803120050057

Лучевая терапия почти всегда применяется при лечении солидных злокачественных новообразований, что во многих случаях имеет успех. К сожалению, довольно часто опухоли человека оказываются резистентными к воздействию ионизирующего излучения, и поэтому актуальной является проблема радиосенсибилизации – дополнительных обработок, направленных на усиление радиационного ответа в опухолях-мишенях [1–4]. Использование радиотерапии в комбинации с химиотерапией может давать хороший результат, так как многие противоопухолевые лекарства усиливают цитотоксическое действие облучения на раковые клетки. Однако такое комбинирование не всегда эффективно, потому что некоторые злокачественные опухоли обладают так называемой

“множественной лекарственной устойчивостью”, когда специальные мембранные транспортеры быстро избавляют раковую клетку от проникающих в нее фармпрепаратов [5, 6]; в таких случаях гипертермия представляется альтернативным способом радиосенсибилизации.

Основной целью данного исследования была проверка возможности применения гипертермической обработки для радиосенсибилизации опухолевых клеток, обладающих радио- и химиорезистентным фенотипом. Для этого проводились сравнительные эксперименты на клетках MCF-7 – охарактеризованной клеточной линии, происходящей из карциномы молочной железы человека, и клетках сублинии MCF-7/MDR1, которые более радиорезистентны, чем клетки материнской

линии MCF-7 [7], а кроме того, обладают выраженным химиорезистентным фенотипом благодаря гиперэкспрессии в них гена *MDR1*, ответственного за множественную лекарственную устойчивость [6]. Функционально активным продуктом этого гена является трансмембранный гликопротеин gp170, работающий как АТФ-зависимый насос, способный выкачивать из клетки некоторые ксенобиотики, в том числе противоопухолевые агенты [6]. Ранее было показано, что те концентрации доксорубина и низкомолекулярных ингибиторов активности HSP90, которые оказывали сильное радиосенсибилизирующее действие на клетки MCF-7, практически не влияли на радиочувствительность клеток MCF-7/*MDR1* [7]. Таким образом, сравнение этих двух клеточных линий представляется хорошей экспериментальной моделью в рамках заявленной цели.

Кроме того, нас интересовали молекулярные механизмы термо-радиосенсибилизации опухолей. Известно, что на молекулярно-клеточном уровне радиосенсибилизирующие эффекты гипертермического стресса позитивно коррелируют со степенью его протеотоксичности, которая выражается в тепловой денатурации и агрегации многих термолабильных клеточных белков, причем в этот процесс вовлечены белки теплового шока HSP90, HSP70, HSP27 и др. [8]. Также известно, что клетки млекопитающих специфически реагируют на любое протеотоксическое воздействие, запуская транскрипционный стресс-ответ, при котором активируется транскрипционный фактор HSF1 и начинается HSF1-опосредованная транскрипция генов *HSP* [9]. Поэтому, чтобы сравнить реакции клеток MCF-7 и MCF-7/*MDR1* на протеотоксичность гипертермического стресса, мы оценивали в них динамику теплового (транскрипционного) стресс-ответа и динамику ко-агрегации HSP90, HSP70 и HSP27 с термо-денатурированными клеточными белками.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Основная часть работы проводилась на клетках линейной культуры MCF-7/*MDR1*. Эта радиорезистентная клеточная линия происходит из злокачественной опухоли молочной железы человека и демонстрирует феномен множественной лекарственной устойчивости из-за гиперэкспрессии *MDR1*-гена. В сравнительных экспериментах использовали культуры клеток материнской линии MCF-7, которые не обладают химио- и радиорезистентностью.

Выращенные в чашках Петри клетки подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения (2–8 Гр, терапевтическая установка с источником  $^{60}\text{Co}$ ).

Гипертермическую обработку клеток проводили перед облучением, погружая герметично за-

крытые чашки Петри с клеточными культурами в термостатированную водяную баню RC6 LAUDA (Германия) с температурой 42–44°C. Кроме температуры, варьировали продолжительность пребывания клеток в условиях гипертермии.

Относительные количества апоптотических и некротических клеток определяли на проточном цитофлуориметре “FACS Vantage” (Becton Dickinson, США) после двойного окрашивания клеточных суспензий ФИТЦ-меченным аннексином V и йодистым пропидием по известной методике [10].

Активность работы выкачивающего мембранного насоса (продукт гена *MDR1* gp170) оценивали на том же проточном цитофлуориметре после окрашивания клеточных суспензий флуоресцирующим красителем Hoechst 33342 (Invitrogen, США).

Выживаемость обработанных клеток оценивали в МТТ-тесте, а также по клоногенности (т.е. способности образовывать многоклеточные колонии после цитотоксических воздействий) [10]. Значения факторов изменения дозы (ФИД) для 10% выживания облученных клеток рассчитывали из кривых роста клеточных колоний, как описано ранее [7].

Для анализа уровня экспрессии генов осуществляли сбор проб РНК спустя 0 (сразу после воздействия), 2, 4 и 24 ч после гипертермической обработки клеток (43°C в течение 1 ч в водяной бане), а также в контрольных клетках, не подвергавшихся действию повышенной температуры. Клетки лизировали при помощи реагента RNazol (Sigma, США). Дальнейшее выделение и очистку РНК проводили согласно инструкции производителя. Качество очищенной РНК проверяли при помощи электрофореза по соотношению 16S и 28S рибосомальной РНК в пробе, а также на спектрофотометре “NanoDrop” (NanoDrop Technologies, США). По 1 мкг РНК с каждой пробы брали для получения кДНК при помощи набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе “Терцик” (ДНК-технология, Россия). Анализ уровня экспрессии генов осуществляли при помощи ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе “Rotor Gene” (“Corbet Research”, Австралия) с использованием набора реагентов “SYBR® Premix Ex Taq™ II” (TaKaRa Bio Inc., Япония) согласно инструкции производителя. Обработку данных для анализа изменения уровня экспрессии генов, что отражает транскрипционный ответ на ГТ, проводили методом дельта-дельта *Ct* [11], в качестве референсного был выбран ген “домашнего хозяйства” *ALAS1*. После-

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, используемых в работе  
**Table 1.** Sequences of primers used in the work

№	Целевой ген	Последовательность 5' → 3' и тип праймера (F – прямой, R – обратный)	Длина ампликона, п.о.
1	HSP27	<b>F:</b> GTGTCCCTGGATGTCAACCACTT	112
2		<b>R:</b> TGTAGCCATGCTCGTCCTGC	
3	HSP70	<b>F:</b> CCTGCGAGAGGGCCAAGA	111
4		<b>R:</b> CGAACCTCGCCCTGGTGA	
5	ALAS1	<b>F:</b> TGCTGCAAAGATCTGACCCCTC	113
6		<b>R:</b> AAACCTCATGGGCCACATCACAC	

довательности прямых и обратных праймеров, используемых в работе, приведены в табл. 1.

Изменения относительного содержания шаперонов HSP90, HSP70 и HSP27 в цитозольной (Тритон X-100-растворимой) и в содержащей белковые агрегаты ядерно-цитоскелетной (Тритон X-100-нерастворимой) фракциях определяли с помощью иммуноблоттинга и последующего сканирования проявленных блотов [12, 13]. После теплового стресса клетки инкубировали в присутствии циклогексимида (50 мкг/мл), чтобы исключить прирост содержания HSPs в цитозоле за счет их *de novo* синтеза.

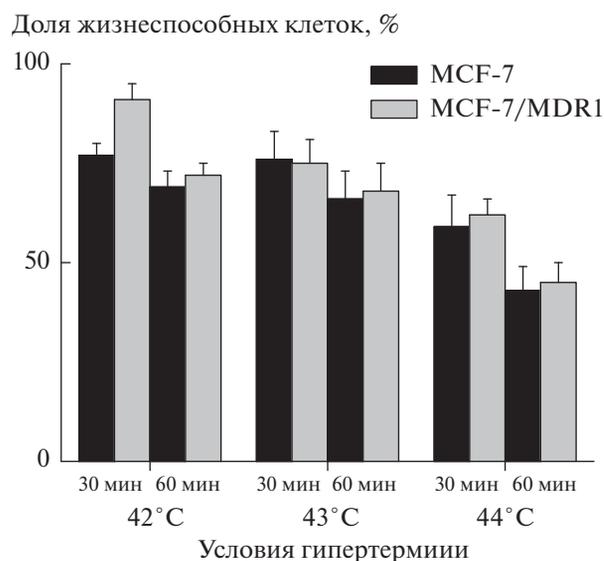
Все количественные результаты представлены как усредненные данные 4–6 независимых экспериментов с тремя повторностями для каждой точки. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна–Уитни с помощью программы “Statistica 6.0” (“Microcal Software, Inc.”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку ранее нами было установлено, что химиорезистентные клетки линии MCF-7/MDR1 более устойчивы к облучению, чем клетки MCF-7 [7], важно было сравнить термочувствительность этих двух опухолевых культур. Результаты МТТ-теста, представленные на рис. 1, как и данные по определению апоптоза и некроза после прогрева (см. контроль без облучения на рис. 2), показывают, что по сравнению с клетками MCF-7 клетки MCF-7/MDR1 не являются значимо более терморезистентными. Такое сходство реакций на гипертермию в этих двух культурах позволяло предположить, что клетки MCF-7/MDR1 тоже возможно радиосенсибилизировать путем предварительного прогрева.

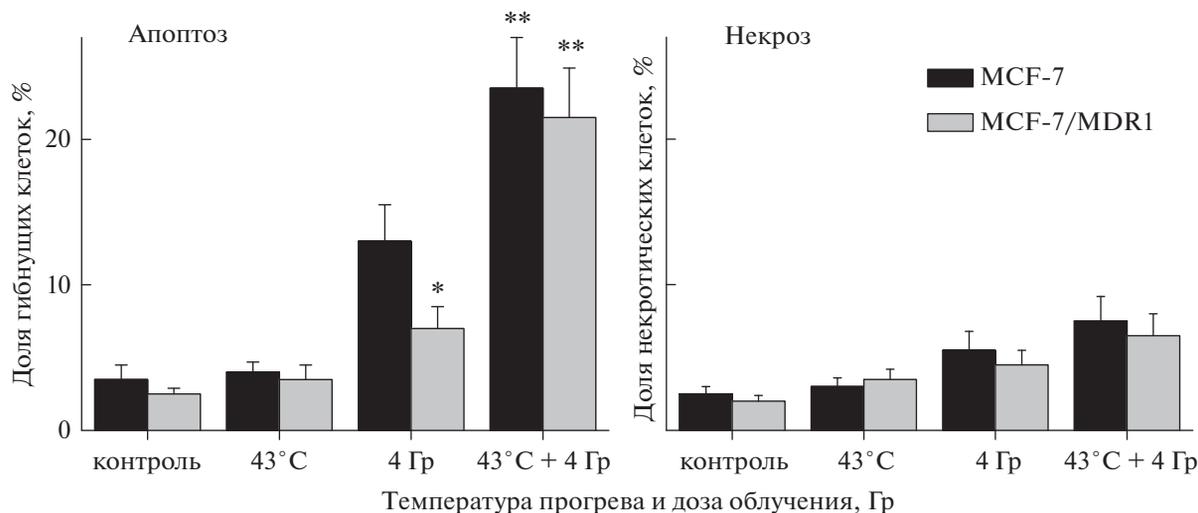
Действительно, сравнительный анализ клоногенности клеток MCF-7/MDR1, облученных без или после прогрева, выявил радиосенсибилизирующие эффекты гипертермической предобработки, причем степень радиосенсибилизации коррелировала с температурой прогрева (рис. 3).

В табл. 2 приведены величины факторов изменения дозы (ФИД), рассчитанные для 10%-ной выживаемости прогретых и облученных клеток обеих линий. Из представленных данных следует, что в качестве радиосенсибилизирующего воздействия гипертермия не менее эффективна для клеток MCF-7/MDR1, чем для клеток MCF-7. Сравнив значения ФИД, можно заметить, что степень радиосенсибилизации прогретых клеток MCF-7/MDR1 вполне сопоставима с таковой в клетках MCF-7, обработанных проникающими в клетку низкомолекулярными радиосенсибилизаторами (см. [7]). Радиосенсибилизирующий эффект гипертермии проявлялся не только в падении клоногенности (рис. 3, табл. 2), но и в значительном



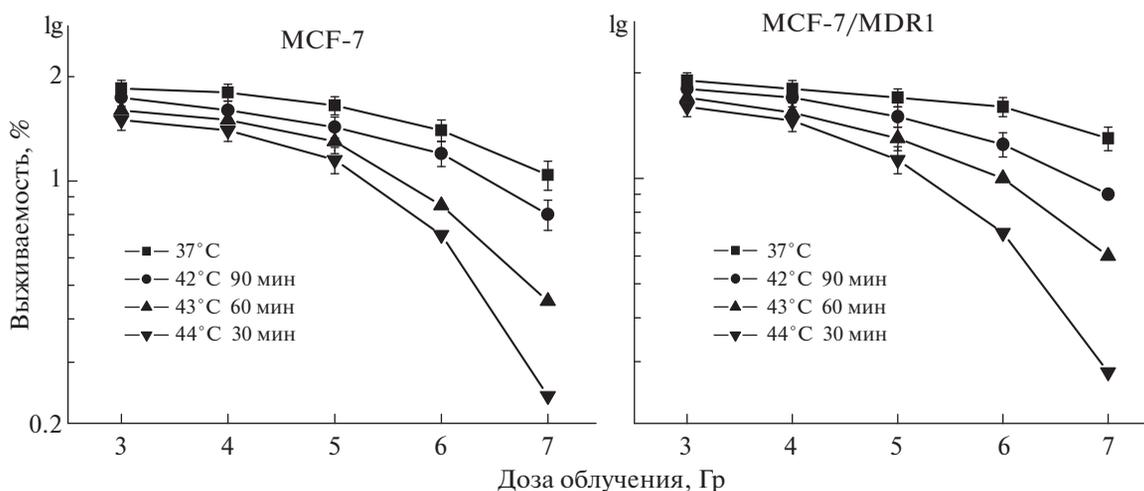
**Рис. 1.** Результаты МТТ-теста, демонстрирующие близкую термочувствительность клеток MCF-7 и MCF-7/MDR1. Среднее значение оптической плотности, полученное для образцов клеток при нормальной температуре (37°C), принимали за 100%.

**Fig. 1.** MTT test results showing similar radiosensitivity of MCF-7 and MCF-7/MDR1 cells. The average optical density obtained for cell samples at normal temperature (37°C) was taken as 100%.



**Рис. 2.** Процент апоптоза и некроза в клетках MCF-7 и MCF-7/MDR1, подвергнутых гипертермии, облучению или комбинации обоих воздействий. \* Значимое отличие от показателей, представленных в виде соседнего (черного) столбика,  $p < 0.05$ . \*\* Значимое отличие от показателей, представленных в виде пары столбиков с пометкой 4 Гр,  $p < 0.05$ .

**Fig. 2.** Percentage of apoptosis and necrosis in MCF-7 and MCF-7/MDR1 cells exposed to hyperthermia, radiation, or a combination of both. \* Significant difference from the neighboring (black) column,  $p < 0.05$ . \*\* Significant difference from a pair of columns marked 4 Gy,  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Результаты теста на клоногенность, демонстрирующие термо-радиосенсибилизацию клеток MCF-7 и MCF-7/MDR1. Выживаемость колоний, полученную для образцов клеток при нормальной температуре (37°С), принимали за 100%.

**Fig. 3.** Clonogenicity test results showing thermo-radiosensitization of MCF-7 and MCF-7/MDR1 cells. The colony survival rate obtained for cell samples at normal temperature (37°С) was taken as 100%.

усилении пострадиационной клеточной гибели. А именно, более чем трехкратное увеличение уровня пострадиационного апоптоза имело место в образцах прогретых клеток MCF-7/MDR1 по сравнению с клетками этой же линии, не подвергшихся гипертермическому воздействию. Причем этот прирост апоптотической фракции был даже больше, чем в прогретых и облученных клетках MCF-7 (рис. 2). В целом результаты анализа клоногенности и клеточной гибели хорошо

согласуются друг с другом. В совокупности все это доказывает возможность эффективного использования гипертермии для радиосенсибилизации радиорезистентных опухолей, невосприимчивых к фармакологическим радиосенсибилизаторам.

Мы также старались исследовать молекулярные механизмы выявленного феномена. Принято считать, что в основе радиосенсибилизирующего

**Таблица 2.** Значения ФИД для клеток MCF-7 и MCF-7/MDR1, радиосенсибилизированных предварительным прогревом**Table 2.** FID values for MCF-7 and MCF-7/MDR1 cells radiosensitized by preheating

Воздействие/клетки	Гипертермия: 42°C, 90 мин	Гипертермия: 43°C, 60 мин	Гипертермия: 44°C, 30 мин
MCF-7	ФИД = 1.15	ФИД = 1.34	ФИД = 1.53
MCF-7/MDR1	ФИД = 1.26	ФИД = 1.30	ФИД = 1.60

**Таблица 3.** Накопление цитозольных шаперонов (HSP90, HSP70 и HSP27) в Тритон X-100-нерастворимых фракциях из клеток MCF-7 и MCF-7/MDR1**Table 3.** Accumulation of cytosolic chaperones (HSP90, HSP70 and HSP27) in Triton X-100-insoluble fractions from MCF-7 and MCF-7/MDR1 cells

Линия клеток	43°C, 20 мин			43°C, 40 мин			43°C, 60 мин		
	HSP90	HSP70	HSP27	HSP90	HSP70	HSP27	HSP90	HSP70	HSP27
MCF-7	20 ± 5%	22 ± 4%	25 ± 6%	55 ± 8%	51 ± 8%	44 ± 7%	80 ± 9%	72 ± 9%	63 ± 8%
MCF-7/MDR1	19 ± 4%	25 ± 7%	22 ± 6%	57 ± 7%	50 ± 6%	38 ± 5%	82 ± 9%	70 ± 8%	65 ± 7%

действия гипертермии лежит термо-денатурация и агрегация белков в клетках-мишенях, что приводит к нарушению клеточного гомеостаза и серьезно затрудняет реализацию механизмов радиопротекции и пострadiационного восстановления [3]. Поскольку ранее были показаны корреляции радиосенсибилизирующих эффектов гипертермии с протеотоксичностью теплового воздействия [8], здесь мы сравнивали проявления протеотоксичности в прогретых клетках MCF-7/MDR1 и MCF-7. Характерными клеточными реакциями на протеотоксический стресс являются активация транскрипционного фактора HSF1 и HSF1-опосредованная экспрессия генов индуцибельных HSP [9]. Поэтому мы проанализировали динамику экспрессии генов индуцибельных HSP27 и HSP70 в двух клеточных культурах, подвергнутых тепловому стрессу, с целью сравнительной оценки протеотоксичности. Эта динамика должна отражать степень повреждения (термо-денатурации) клеточных белков в том и другом случаях. В ходе работы было установлено, что клетки обеих линий – и химиочувствительные клетки MCF-7, и химиорезистентные клетки MCF-7/MDR1, в первые четыре часа после прогрева сходным образом отвечают на тепловой стресс. А именно, запускается экспрессия генов HSP27 и HSP70 (рис. 3) уже в момент действия высокой температуры, и затем наращивается уровень мРНК этих генов в течение, как минимум, 4 ч после окончания прогрева. Эти результаты подтверждают, что химиорезистентные клетки MCF-7/MDR1 почти столь же чувствительны к действию повышенной температуры, как и химиочувствительные клетки MCF-7.

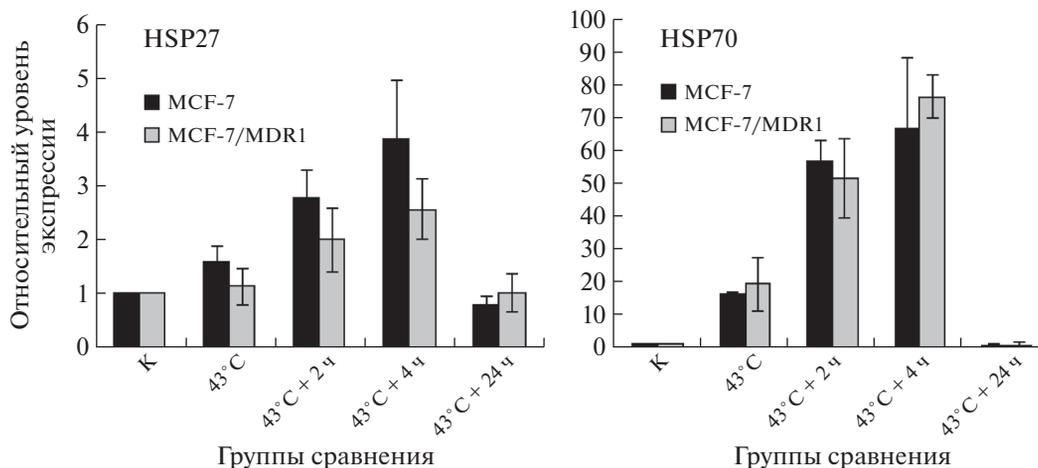
Ранее было показано, что сила радиосенсибилизирующих, цитотоксических и протеотоксических эффектов гипертермии коррелирует с исто-

щением цитозольного пула шаперонов (HSP) за счет их перехода в Тритон X-100-нерастворимую (ядерно-цитоскелетную) фракцию в результате связывания с термо-денатурированными клеточными белками [8]. В этой работе мы проводили аналогичные исследования, чтобы сравнить динамику “инсолюбилизации” HSP90, HSP70 и HSP27 в прогретых клетках MCF-7 и MCF-7/MDR1. Результаты, представленные в табл. 3, демонстрируют для обоих вариантов схожую динамику накопления HSP в ядерно-цитоскелетной фракции, что должно говорить о примерно одинаковых уровнях и скорости термо-денатурации внутриклеточных белков в той и другой культуре. Данные табл. 3 находятся в полном соответствии с показателями, представленными на рис. 4, а также с результатами по клеточной гибели и клоногенности (см. рис. 1–3 и табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что гипертермическая предобработка может значительно усилить цитотоксическое действие  $\gamma$ -излучения на радиорезистентные опухолевые клетки линии MCF-7/MDR1, которые, как было ранее показано, невосприимчивы к “химиотерапевтическим” радиосенсибилизаторам, таким как доксорубин, таксол или 17AAG [7]. Даже относительно мягкие условия гипертермической предобработки позволяют снизить пострadiационную клоногенность MCF-7/MDR1 клеток на 50–80% (рис. 3).

Полученные результаты позволяют утверждать, что раковые клетки с химио- и радиорезистентными фенотипами не обязательно обладают еще и терморезистентностью, причем этот факт можно использовать в терапевтических целях. Чтобы понять молекулярную природу обнару-



**Рис. 4.** Динамика изменения уровня экспрессии генов *HSP27* и *HSP70* в ответ на гипертермию. По оси ординат отложена кратность изменения уровня экспрессии гена *HSP27* и *HSP70* относительно уровня экспрессии этого же гена в контроле (принят за 1). Условные обозначения: “К” – контроль; “43°C” – сразу после прогрева; “43°C + 2 ч”, “43°C + 4 ч”, “43°C + 24 ч” – через 2, 4 и 24 ч после прогрева соответственно.

**Fig. 4.** Dynamics of changes in the level of expression of *HSP27* and *HSP70* genes in response to hyperthermia. On the ordinate axis pending the frequency change of the gene expression levels of *HSP27* and *HSP70* relative expression level of that gene in the control (taken as 1). Symbols: “C” – control; “43°C” – immediately after heating up; “43°C + 2 h”, “43°C + 4 h”, “43°C + 24 h” – 2, 4 and 24 hours after heating up, respectively.

женного феномена, необходимо обсудить механизмы, благодаря которым происходит радиосенсибилизация прогретых клеток-мишеней. Известно, что радиосенсибилизирующие эффекты гипертермии обусловлены, в основном, ее протеотоксичностью, т.е. повреждающим действием теплового стресса на термолабильные клеточные белки, которые денатурируют, теряют функциональную активность и образуют агрегаты. Инактивация и агрегация многих белков в ядре, цитоплазме и органеллах прогретой клетки приводят к нарушению биосинтеза, сигнальной регуляции, ионному дисбалансу и пр., что делает ее более уязвимой к облучению [3, 8]. Соответственно, оценивая уровень протеотоксичности того или иного воздействия на клетки, можно сделать вывод относительно эффективности ожидаемой радиосенсибилизации. Внутриклеточным сенсором протеотоксичности можно считать транскрипционный фактор HSF1, который активируется в ответ на появление в цитоплазме денатурированных и агрегированных белков [9]. Прямым следствием активации HSF1 являются транскрипция *HSP* генов и накопление мРНК, кодирующих индуцибельные HSPs, что можно определить с помощью ПЦР; именно такой подход был нами применен для генов *HSP70* и *HSP27*. Из полученных результатов следует, что в прогретых клетках той и другой культуры HSF1-опосредованные реакции довольно похожи (см. рис. 4), и это говорит о близких уровнях протеотоксичности в обоих случаях, а значит, объясняет, почему термо-радиосенсибилизация практически равно эффективна для

клеток MCF-7 и для радиорезистентных клеток MCF-7/MDR1.

Важным событием в механизме термо-радиосенсибилизации раковых клеток является, на наш взгляд, переход цитозольных HSP90, HSP70 и HSP27 в Тритон X-100-нерастворимую фракцию прогретых клеток (см. табл. 3). Такая спровоцированная клеточным стрессом “инсолюбилизация” шаперонов была описана еще давно [12, 13], и причины этого явления более менее понятны. Когда в испытывавшей тепловой шок клетке многие белки денатурируют и агрегируют, HSPs активно вовлекаются в этот процесс, узнавая белковые молекулы с нарушением нативной структуры и образуя с ними шаперон-субстратные комплексы. Так, цитозольные HSPs коагрегируют с денатурированными белками, и эти агрегаты, достигнув определенных размеров и массы, седиментируют при низкоскоростном центрифугировании клеточных лизатов в Тритон X-100-содержащем буфере [12, 13]. Другая причина обогащения шаперонами Тритон X-100-нерастворимой (ядерно-цитоскелетной) фракции прогретых клеток – это то, что цитозольные HSPs связываются с поврежденными сайтами изначально нерастворимых в детергенте белковых структур цитоскелета, хроматина и ядерного матрикса. И одно, и другое являются естественным проявлением биологической (шаперонной) функции HSPs, которые должны взаимодействовать с поврежденными стрессом белками, чтобы способствовать их ренатурации и дезагрегации или деградации [12, 13]. Считается, что “отвлечение” HSP70 и HSP90 на вза-

имеет действие с денатурированными белками приводит к распаду комплексов HSP70-HSF1-HSP90, благодаря чему HSF1 освобождается, активируется и запускает транскрипцию *HSP* генов [9]. Важно, что в течение какого-то промежутка времени после прогрева шаперонная функция HSPs может быть в конфликте с их антиапоптотической функцией. Действительно, и HSP90, и HSP70, и HSP27 известны как эндогенные супрессоры апоптоза; они образуют ингибирующие комплексы с эффекторами апоптоза (цитохром-Ц, Araf-1, каспазы и др.) или активирующие комплексы с антиапоптотическими белками (Akt, сюрвивин и др.) и таким образом способны блокировать каскады реакций, ведущие к апоптотической гибели клетки [14, 15]. Сразу после теплового шока в клетке, вероятно, возникает своего рода конкуренция между белковыми субстратами за связывание с цитозольными шаперонами (HSPs) [8]. Очевидно, что появившиеся в большом количестве термо-денатурированные внутриклеточные белки будут рекрутировать HSP90, HSP70 и HSP27, тем самым не давая этим шаперонам взаимодействовать с белками-регуляторами апоптоза и прерывать исполнение апоптотического сценария. По своей сути, такие внутриклеточные конфликты и конкуренции есть осуществление физиологического “контроля качества”: клетка, перенесшая стресс и получившая слишком серьезные повреждения, должна быть элиминирована через апоптоз. Здесь мы показали, что этот же механизм, по-видимому, можно реализовать и в отношении радиорезистентных опухолевых клеток: в прогретых MCF-7/MDR1 клетках истощается цитозольный пул шаперонов (см. табл. 3), и после облучения в них интенсифицируется апоптоз (см. рис. 2), что свидетельствует о термо-радиосенсибилизации этих клеток, которая определялась и в других тестах (рис. 1 и 3).

Множественная лекарственная устойчивость опухолей является одной из главных проблем в лечении рака. Многие злокачественные новообразования человека оказываются устойчивыми к химиотерапии или приобретают такую устойчивость в процессе лечения [5]. Если опухоль, демонстрирующая множественную лекарственную устойчивость, к тому же еще и радиорезистентна, это резко сужает возможности консервативной терапии, тем более что применение фармакологических радиосенсибилизаторов не имеет здесь перспектив по понятной причине. Мы полагаем, что в таких случаях гипертермия, вызывающая радиосенсибилизацию химио- и радиорезистентных опухолей, может существенно повысить эффективность лучевой терапии. В пользу этого говорят наши экспериментальные данные, полученные на сублинии опухолевых клеток MCF-7/MDR1, обладающих химио- и радиорезистентностью. Современные устройства для клинической гипертермии

позволяют с помощью фокусирования высокочастотных или ультрачастотных электромагнитных полей создавать локальный прогрев опухоли-мишени без серьезного повреждения прилегающих нормальных тканей [16]. Следовательно, предлагаемый нами способ вполне применим на практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование показало, что терморезистентность не ассоциируется с радио- и химиорезистентным фенотипом раковых клеток и, следовательно, локальная гипертермия может успешно применяться для радиосенсибилизации радиорезистентных солидных опухолей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hyperthermic oncology from bench to bedside / Eds. S. Kokura, T. Yoshikawa, T. Ohnishi. Springer, 2016. 444 p.
2. Peeken J.C., Vaupel P., Combs S.E. Integrating hyperthermia into modern radiation oncology: What evidence is necessary? // *Front. Oncol.* 2017 Jun 30. V. 7. P. 132. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00132>
3. Кабаков А.Е., Анохин Ю.Н., Лебедева Т.В. Реакции нормальных и опухолевых клеток и тканей на гипертермию в сочетании с ионизирующей радиацией. Обзор // *Радиация и риск.* 2018. Т. 27. № 4. С. 141–154. [Kabakov A.E., Anokhin Yu.N., Lebedeva T.V. Reactions of normal and tumor cells and tissues to hyperthermia in combination with ionizing radiation. Review // *Radiation and risk.* 2018. V. 27. № 4. P. 141–154. (in Russian)]
4. Курпешев О.К., ван дер Зее Я. Анализ результатов рандомизированных исследований по гипертермии в онкологии. Обзор // *Медиц. радиология и радиац. безопасность.* 2018. Т. 63. № 3. С. 52–67. [Kurpeshev O.K., van der Zee J. Results of Randomized Studies on Hyperthermia in Oncology // *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2018. V. 63. № 3. P. 52–67. (in Russian)] [https://doi.org/10.12737/article\\_5b179d60437d54.24079640](https://doi.org/10.12737/article_5b179d60437d54.24079640)
5. Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S. et al. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review // *Adv. Pharm. Bull.* 2017 Sep. V. 7. № 3. P. 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
6. Katayama K., Noguchi K., and Sugimoto Y. Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells // *New J. Sci.* V. 2014. Art. ID 476974. 10 p. <https://doi.org/10.1155/2014/476974>
7. Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A. et al. Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: A predictive marker and promising target for radiosensitization // *PLoS One.* 2017. Mar. 14. V. 12. № 3. e0173640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173640>

8. *Кабаков А.Е., Кудрявцев В.А., Хохлова А.В. и др.* Апоптоз в опухолевых клетках, подвергнутых сочетанному действию гипертермии и облучения: исследование молекулярных механизмов и мишеней // *Радиация и риск.* 2018. Т. 27. № 2. С. 62–75. [*Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V. et al.* Apoptosis in tumor cells subjected to the combined action of hyperthermia and irradiation: a study of the molecular mechanisms and targets // *Radiation and Risk.* 2018. V. 27. № 2. P. 62–75. (in Russian)]
9. *Anckar J., Sistonen L.* Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annu Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 1089–1115. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>
10. *Kabakov A.E., Gabai V.L.* Cell death and survival assays // *Meth. Mol. Biol.* 2018. V. 1709. P. 107–127.
11. *Schmittgen T.D., Livak K.J.* Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nature Prot.* 2008. V. 3. № 6. P. 1101–1108.
12. *Kabakov A.E., Gabai V.L.* Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stresses // *Experientia.* 1993. V. 49. № 8. P. 706–713.
13. *Kabakov A.E., Gabai V.L.* Stress-induced insolubilization of certain proteins in ascites tumor cells // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 309. № 2. P. 247–253.
14. *Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A.* Heat shock proteins as molecular targets for anticancer therapy: approaches, agents, and trends // *Heat shock proteins. Classifications, functions, and applications* / Ed. S. Usmani. New York: Nova Science Publishers, 2013. P. 25–56.
15. *Kennedy D., Jager R., Mosser D.D. et al.* Regulation of apoptosis by heat shock proteins // *IUBMB Life.* 2014. V. 66. № 5. P. 327–338.
16. *Курпешев О.К., van der Zee J.* Локорегионарная гипертермия злокачественных опухолей: Методики, термометрия, аппаратура // *Мед. радиология и радиац. безопасность.* 2017. Т. 62. № 5. С. 52–63. [*Kurpeshev O.K., van der Zee J.* Locoregional Hyperthermia of Malignant Tumors: Methods, Thermometry, Machines // *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2017. V. 62. № 5. P. 52–63. (in Russian)]

## Hyperthermia as a Method of Radiosensitization of Tumor Cells Unsusceptible to Pharmacological Radiosensitizers

A. V. Khokhlova<sup>a</sup>, A. O. Yakimova<sup>a</sup>, V. A. Mosina<sup>a</sup>, E. I. Selivanova<sup>a</sup>, and A. E. Kabakov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

\*E-mail: aekabakov@hotmail.com

The possibility of using hyperthermia for effective radiosensitization of tumor cells with a radio- and chemoresistant phenotype was tested in an in vitro model. The work was performed on MCF-7/MDR1 cell subline originated from human breast carcinoma and demonstrating the phenomenon of multidrug resistance due to overexpression of the MDR1 gene. In comparative experiments, the maternal MCF-7 cell line was used. Cell cultures were subjected to heat stress (42–44°C, 30–90 min), then they were irradiated with  $\gamma$ -photons in doses of 2–8 Gy. The cytotoxicity of the treatments was evaluated in the MTT test, also on the intensity of apoptosis and necrosis, or on a decrease in clonogenicity. The transcriptional stress response of heated cells was studied in real-time PCR, determining the accumulation of mRNAs encoding inducible heat shock proteins HSP70 and HSP27. It was established that MCF-7/MDR1 radio- and chemoresistant cells do not have the increased thermoresistance, and their reactions to heat stress are comparable to those of MCF-7 cells. At the same time, it was shown that hyperthermic pretreatment significantly enhances the cytotoxic effects of  $\gamma$ -radiation on MCF-7/MDR1 cells; this proves the possibility of the effective use of hyperthermia for radiosensitization of radioresistant tumors which exhibit multidrug-resistance and unsusceptible to chemotherapeutic radiosensitizers. The molecular mechanisms of thermo-radiosensitization of tumor cells are here considered herein.

**Keywords:** transcriptional stress response, heat shock proteins, HSF1, radioresistance, MDR1, chemoresistance, cancer cells, radiation therapy

## КОМБИНИРОВАННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

УДК 57.042:546.3:612.591.1.047

### ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ СИНЕРГИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ГИПЕРТЕРМИЕЙ ИЛИ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

© 2020 г. М. С. Толкаева<sup>1</sup>, А. Н. Филимонова<sup>2</sup>, О. А. Воробей<sup>1</sup>, Е. С. Евстратова<sup>2,\*</sup>, В. Г. Петин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

\*E-mail: ekevs7240@mail.ru

Поступила в редакцию 06.11.2019 г.

После доработки 05.02.2020 г.

Принята к публикации 12.02.2020 г.

Задачей исследования было выявить общие закономерности проявления синергизма одновременного действия солей тяжелых металлов с ионизирующим излучением или с гипертермией. Объектом исследований были бактерии *Escherichia coli* (штамм B/r) и диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800), на которых в стационарной стадии роста воздействовали химическими препаратами, содержащими соли тяжелых металлов (медь, платина, свинец, хром, цинк) одновременно с гипертермией (37–60°C) или ионизирующим излучением ( $\gamma$ -кванты <sup>60</sup>Co, мощность дозы 10.8 Гр/мин). Для демонстрации общности выявленных закономерностей использованы данные по инаktivации клеток китайского хомячка (СНО), опубликованные другими авторами. Для количественной оценки степени синергизма мы использовали коэффициент синергического усиления, определяемый отношением изоэффективных доз на теоретически ожидаемой и экспериментальной кривых доза–эффект. Приводятся экспериментальные результаты о выживаемости клеток и синергическом взаимодействии повреждений от одновременного применения солей тяжелых металлов с ионизирующим излучением или гипертермией. Выявлены оптимальные параметры действующих агентов, обеспечивающие максимальное синергическое взаимодействие. Любое отклонение этих параметров от оптимального значения приводит к снижению синергизма. Делается вывод об универсальности выявленных закономерностей, не зависящих от природы воздействующих агентов, биологических объектов и тестов. Обсуждаются возможные механизмы полученных результатов и пути их практического использования в радиобиологии и экологии.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, тяжелые металлы, гипертермия, синергизм, бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих

**DOI:** 10.31857/S0869803120050094

Комбинированное действие различных вредных факторов окружающей среды является отличительной чертой современной жизни. Хорошо известно синергическое взаимодействие физических и химических агентов, когда их вредное действие усиливается по сравнению с ожидаемым действием при независимом сложении эффектов от каждого агента [1, 2]. Описана математическая модель, в соответствии с которой синергизм обусловлен формированием дополнительных эффективных повреждений в результате взаимодействия неэффективных повреждений, образуемых при раздельном применении агентов [3]. Модель прогнозирует ряд общих закономерностей проявления синергизма, которые не зависят от биологического объекта, теста и применяемых агентов. Предсказания модели хорошо соответствуют экс-

периментальным результатам [1, 4]. Показано, что синергизм может не наблюдаться при любых, случайно выбранных параметрах воздействующих факторов. Существует оптимальное соотношение доз или интенсивностей применяемых агентов, при которых наблюдается максимальное синергическое взаимодействие, отклонение от которого приводит к уменьшению синергизма, вплоть до его полного отсутствия [5–7].

В настоящее время особое значение приобретает загрязнение биосферы различными химическими агентами. Ежегодно более 500 официально зарегистрированных веществ внедряются в практику в виде лекарственных препаратов, пищевых добавок, пестицидов и промышленных соединений, загрязняющих окружающую среду [8]. Ясно, что различные химические поллютанты в био-

сфере действуют одновременно с другими факторами внешней среды, синергически усиливающими их вредное действие. Многие лекарственные средства используются также в комбинации с ионизирующим излучением или гипертермией, применяемыми для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований [9, 10]. В состав различных лекарственных средств входят соли тяжелых металлов, к которым относят группу веществ с большим атомным весом, обладающих свойствами металлов. Некоторые препараты для химиотерапии также содержат в своем составе тяжелые металлы как основную составляющую. Представляет интерес исследовать экспериментально их совместное действие с ионизирующим излучением или гипертермией для оптимизации методов сочетанной терапии.

Большой интерес для проблем радиобиологии и экологии представляют малоисследованные закономерности одновременного действия солей тяжелых металлов с гипертермией, поскольку эти элементы относятся к числу наиболее распространенных токсических компонентов окружающей среды. Тяжелые металлы как микроэлементы постоянно встречаются в почве, воде, растениях и организмах животных и человека. Однако их синергическое взаимодействие с другими факторами окружающей среды практически не изучено. Сложность количественной оценки комбинированного воздействия обуславливается двумя факторами – недостаточностью знаний о молекулярно-клеточном механизме действия каждого фактора и их сочетаний, а также отсутствием единого методологического и концептуального подхода к изучению механизма синергического взаимодействия факторов различной природы [1, 4, 11–13].

Поэтому проблема экспериментального изучения синергических взаимодействий солей тяжелых металлов с ионизирующим излучением и гипертермией приобретает все большую актуальность. В связи с этим перед данным исследованием были поставлены следующие задачи – экспериментально продемонстрировать синергическое взаимодействие различных солей тяжелых металлов с гипертермией и ионизирующим излучением, выявить общие закономерности проявления синергических эффектов, представить их интерпретацию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом собственных экспериментальных исследований были бактерии *Escherichia coli* (штамм *B/r*) и диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800), на которых в стационарной стадии роста воздействовали химическими препаратами, содержащими соли тяжелых металлов (медь, платина, свинец, хром, цинк) одновременно с гипертермией (37–60°C)

или ионизирующим излучением ( $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$ , мощность дозы 10.8 Гр/мин). Используемые в экспериментах диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, штамм XS800, являются простейшей моделью эукариотических клеток, строение которых сходно с клетками высших организмов и которые характеризуются наличием ядра и хромосом.

Гипертермию осуществляли в медицинском водяном термостате (ELMI, TW-2.03), где нужная температура поддерживалась в пределах  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ . Для одновременного действия гипертермии с химическими препаратами интервал времени между помещением клеток в предварительно прогретую стерильную воду и началом воздействия препарата составлял 0.1–0.3 мин, что было значительно меньше общей продолжительности воздействия. В опытах использованы следующие растворы солей тяжелых металлов: цисплатин (цис-диаминдихлорплатина,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ , производитель ООО ЛЭНС ФАРМ), концентрация составляла 0.25 мг/мл; йодид свинца(II),  $\text{PbI}_2$  0.5–2.5 мг/мл; двуххромовокислый калий,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  5 мг/мл; сульфат меди,  $\text{CuSO}_4$  0.02 мг/мл; сульфат цинка,  $\text{ZnSO}_4$  0.01 моль/л. Концентрации препаратов подобраны экспериментально: инактивация клеток от действия препарата находилась в диапазоне 40–60%. Облучение ионизирующим излучением проводили на установке “Исследователь”, Россия ( $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$ , мощность дозы 10.8 Гр/мин). По окончании раздельного применения гипертермии, химических препаратов, ионизирующего излучения и их одновременного комбинированного воздействия клетки помещали в чашки Петри с твердой питательной средой так, чтобы образовывались 150–200 колоний после 24-часовой инкубации бактерий при 37°C и 3–5-суточной инкубации дрожжевых клеток при 30°C. Выживаемость клеток оценивали отношением колоний, сформированных при воздействии разных факторов, к числу колоний, образованных в контроле. Все экспериментальные серии повторяли 3–5 раз. Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки. Детали методов культивирования, определения выживаемости, статистической обработки описаны ранее [1, 4–6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1, а–д приведены зависимости выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *S. cerevisiae* от продолжительности применения одной гипертермии (кривые 1), воздействия только раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (кривые 2); одновременного действия этих агентов (кривые 4). Кривые 3 на этом рисунке – теоретически рассчитанные кривые выживаемости для независимого сложения эф-

факторов от действия повышенных температур и растворов тяжелых металлов. Отметим, что при независимом действии агентов вероятность регистрируемого эффекта, в соответствии с известным положением теории вероятности [14, 15], определяется не простым суммированием эффектов, а произведением вероятностей эффектов, индуцированных каждым агентом в отдельности. Так, для выживаемости клеток имеем

$$S = S_1 \cdot S_2, \quad (1)$$

где  $S$  – вероятность выживаемости клеток после комбинированного воздействия, а  $S_1$  и  $S_2$  – вероятности выживаемости после действия каждого из применяемых агентов в отдельности. Тогда после логарифмирования уравнения (1) имеем

$$\ln S = \ln S_1 + \ln S_2 \quad \text{или} \quad \lg S = \lg S_1 + \lg S_2. \quad (2)$$

Это означает, что независимое действие двух агентов характеризуется сложением логарифмов вероятностей выживаемости или другого тест-эффекта. В соответствии со статистикой Пуассона [14, 15] число повреждений, индуцированных фактором, вызывающим инактивацию клеток, может быть определено как

$$N = -\ln S. \quad (3)$$

Тогда уравнение (2) означает, что суммарное число повреждений, образуемых при независимом действии двух факторов, определяется суммой повреждений, образованных каждым из действующих факторов.

Все упомянутые кривые выживаемости необходимы для определения характера взаимодействия и оценки коэффициента синергического усиления. Из рис. 1 видно, что во всех случаях наблюдается их синергическое взаимодействие – экспериментальные кривые после комбинированного воздействия расположены ниже ожидаемых при независимом сложении эффектов от каждого агента. Для количественной оценки степени синергизма мы использовали коэффициент синергического усиления ( $k$ ) [1, 4, 5], определяемый отношением изоэффективных доз на теоретически ожидаемой и экспериментальной кривых доза–эффект. Вместо дозы в данном исследовании мы использовали продолжительность воздействия.

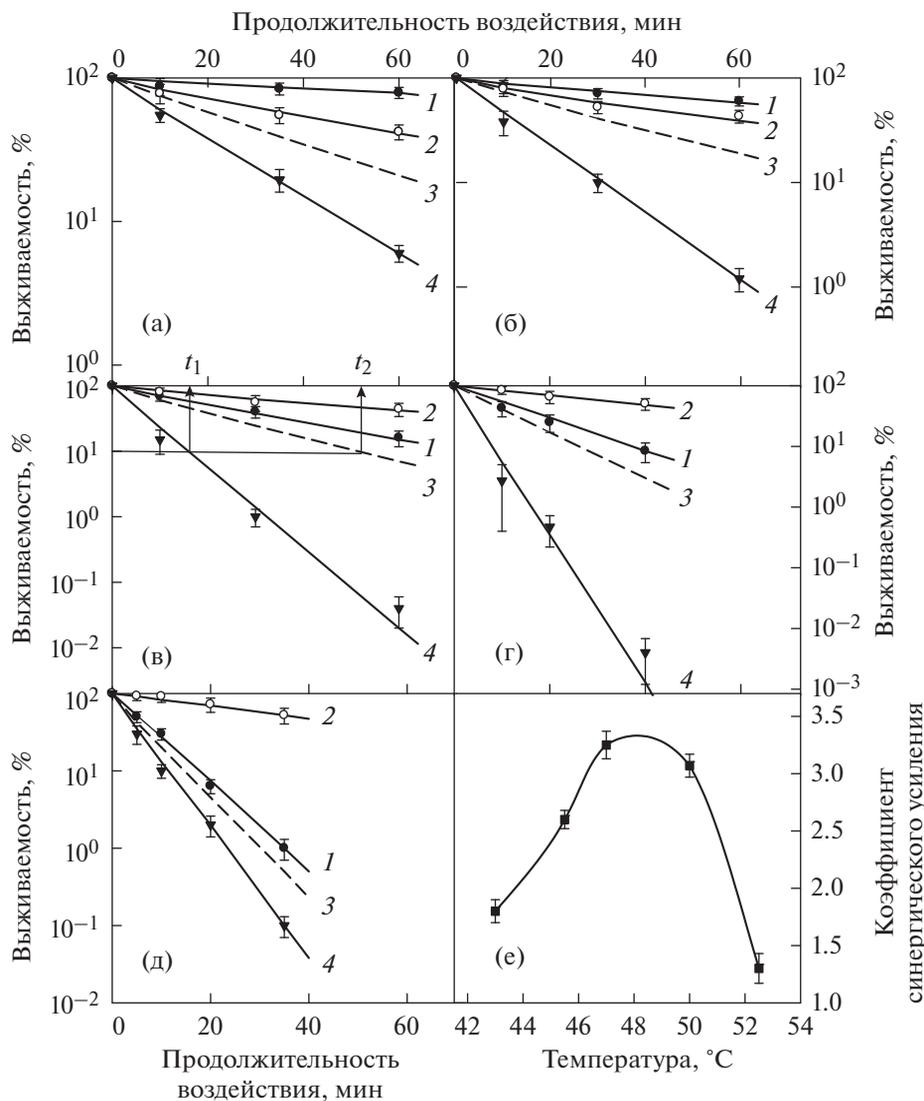
$$k = t_2/t_1. \quad (4)$$

Фактически этот коэффициент показывает, во сколько раз для одинакового эффекта уменьшилась продолжительность ожидаемого воздействия ( $t_2$ ) по сравнению с наблюдаемой в эксперименте величиной ( $t_1$ ). На рис. 1, в стрелками указан пример расчета этого коэффициента. Отметим, что для каждой экспериментальной точки на последующих рисунках для расчета коэффициента синергического усиления (уравнение (4))

использованы четыре таких кривых выживаемости. Аналогичный набор кривых доза–эффект получен и для других комбинированных воздействий. В целом итоговые данные этой статьи базируются на примерно 100 кривых, описывающих зависимость выживаемости клеток от продолжительности раздельного действия ионизирующего излучения, гипертермии, химических агентов и их совместного применения, а также теоретические кривые выживаемости, рассчитанные для независимого действия агентов. Приводить все эти графические данные не представляется возможным, но именно они использованы для получения итоговых данных на последующих рисунках. Экспериментальные значения степени инактивации эукариотических клеток повышенной температурой и химическими сенсibilизаторами также представлены в базе данных, получившей регистрацию в Роспатенте [16]. Отметим, что небольшие фрагменты представляемых ниже результатов были опубликованы ранее [1, 4], но в полном виде они представляются впервые.

На основании кривых выживаемости, представленных на рис. 1, рассчитана зависимость коэффициента синергического усиления от температуры, действующей одновременно с раствором двухромовокислого калия  $K_2Cr_2O_7$  на диплоидные дрожжевые клетки (рис. 1, е). Видно, что отмечается куполообразная закономерность – синергизм сначала возрастает с увеличением действующей температуры, достигает максимального значения и затем снова уменьшается. На рис. 2 приведены аналогичные зависимости для диплоидных дрожжевых клеток после одновременного действия гипертермии с сульфатом меди (а) и цисплатином (б). Видно, что во всех случаях также отмечается куполообразная зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры. Внутри диапазона применяемых температур регистрируется оптимальное значение температуры, обеспечивающей максимальный синергический эффект. Любое отклонение действующей температуры от оптимальной приводит к снижению эффективности синергического усиления.

Представляет интерес выяснить, сохраняется ли выявленная закономерность для прокариот и высших эукариот. Поэтому для демонстрации общности выявленных закономерностей мы использовали данные по инактивации клеток китайского хомячка (СНО) при раздельном и одновременном действии повышенных температур (40–43°C) и цисплатина, опубликованных другими авторами [12, 13]. Используя результаты этих авторов, мы провели количественную оценку синергического взаимодействия агентов. На рис. 3 приводятся зависимости коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии



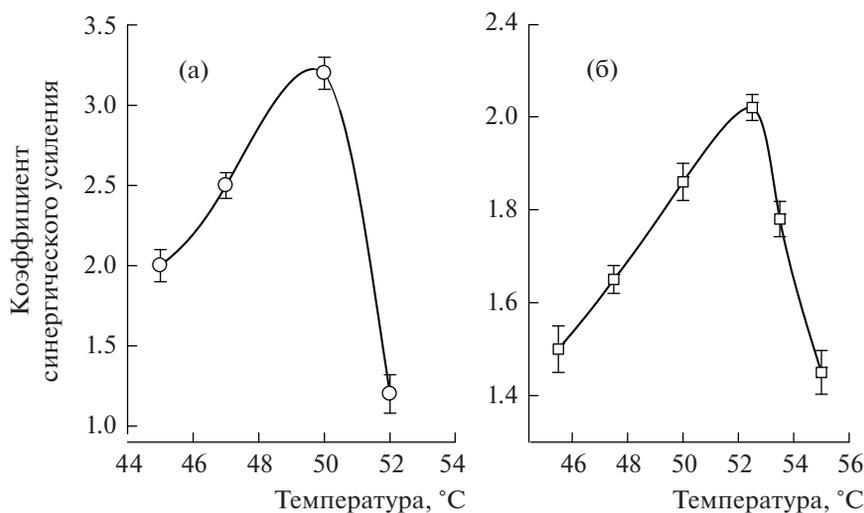
**Рис. 1.** Зависимости выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *S. cerevisiae* (штамм XS800) от продолжительности воздействия гипертермии: кривые 1 – действие только температур: а – 43°C; б – 45.5°C; в – 47°C; г – 50°C; д – 52.5°C; кривые 2 – действие раствора  $K_2Cr_2O_7$  (5 мг/мл); кривые 3 – теоретически рассчитанные кривые выживаемости для независимого сложения эффектов от действия температур и растворов тяжелых металлов; кривые 4 – экспериментально полученные кривые выживаемости после одновременного действия этих агентов; е – зависимость коэффициента синергического усиления от одновременного воздействия гипертермии и раствора  $K_2Cr_2O_7$  (5 мг/мл).

**Fig. 1.** Dependence of the *S. cerevisiae* (strain XS800) diploid yeast cells survival on the duration of hyperthermia exposure: curves 1 – only temperatures action: а – 43°C; б – 45.5°C; в – 47°C; г – 50°C; д – 52.5°C; curves 2 – only effect of a solution of  $K_2Cr_2O_7$  (5 mg/ml); curves 3 – theoretically calculated survival curves for the independent addition of effects from the action of temperatures and solutions of heavy metals; curves 4 – experimentally obtained survival curves after the simultaneous action of these agents; е – dependence of the synergistic enhancement ratio on the simultaneous effects of hyperthermia and  $K_2Cr_2O_7$  solution (5 mg/ml).

с сульфатом цинка  $ZnSO_4$  на инактивацию бактерий *Escherichia coli* штамм *B/r* и с цисплатином на выживаемость клеток китайского хомячка СНО. Отметим, что для расчета последней зависимости мы использовали данные, опубликованные другими авторами [12, 13], которые сами такую оценку не проводили. Видно, что и в этом случае наблюдается куполообразная зависимость коэффициента синергического усиления от действующей

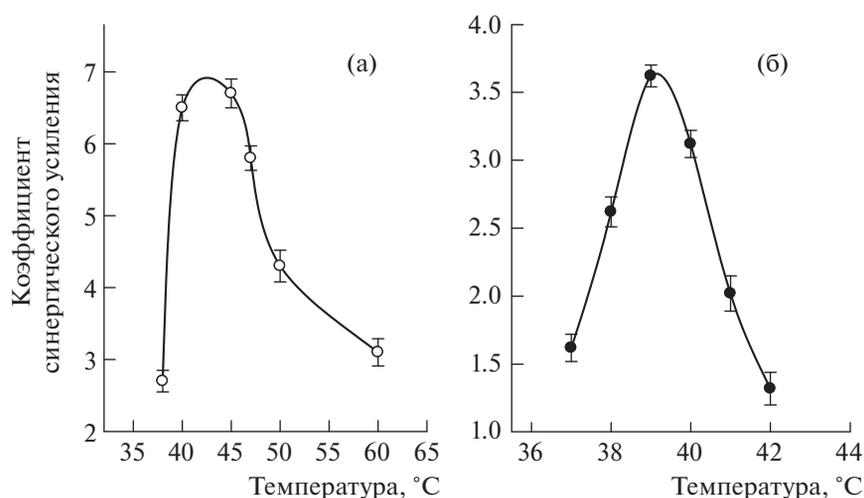
температуры. Таким образом, совокупность новых данных, полученных в настоящей работе, показывает, что эта закономерность не зависит от варианта применяемых солей тяжелых металлов и исследованного биологического объекта.

На рис. 4, а приведена зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с йодидом свинца(II)  $PbI_2$  (1 мг/мл)



**Рис. 2.** Зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с  $\text{CuSO}_4$  (0.02 мг/мл) (а) и с цисплатином (0.25 мг/мл) (б) на диплоидные дрожжевые клетки *S. cerevisiae* (штамм XS800).

**Fig. 2.** The dependence of the synergistic enhancement ratio on the current temperature after the simultaneous use of hyperthermia with  $\text{CuSO}_4$  (0.02 mg/ml) (a) and cisplatin (0.25 mg/ml) (b) on diploid yeast cells of *S. cerevisiae* (strain XS800).



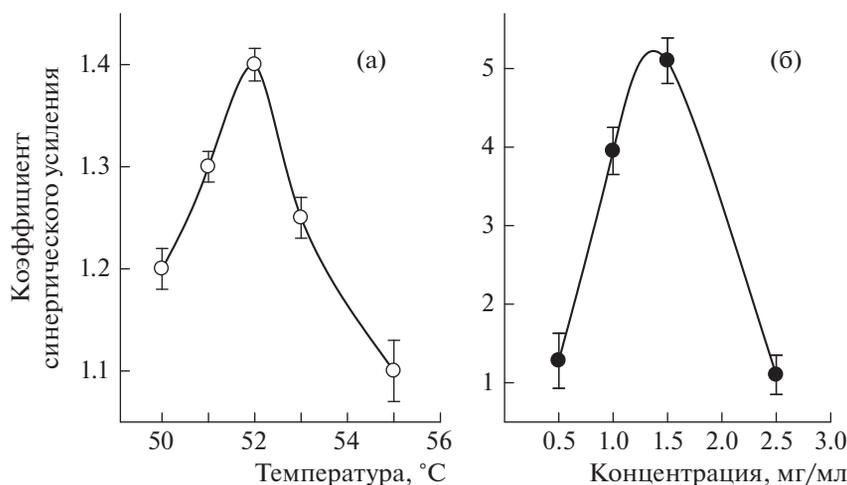
**Рис. 3.** Зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с сульфатом цинка  $\text{ZnSO}_4$  (0.01 моль/л) на бактерии *Escherichia coli* штамм B/r (а) и с цисплатином на клетки китайского хомячка CHO (б).

**Fig. 3.** The dependence of the synergistic enhancement ratio on the current temperature after the simultaneous use of hyperthermia with zinc sulfate  $\text{ZnSO}_4$  (0.01 mol/l) on the bacteria *Escherichia coli* strain B/r (a) and with cisplatin on the Chinese hamster CHO cells (b).

на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800). Снова четко видно существование максимального синергизма при 52 °C. На рис. 4, б представлена зависимость коэффициента синергического усиления от концентрации раствора йодида свинца(II) после его одновременного применения с ионизирующим излучением на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800). Видно, что при постоянной мощности дозы реги-

стрируется оптимальная концентрация препарата, обеспечивающая максимальный синергический эффект.

Подчеркнем, что впервые полученные в данной работе результаты комбинированного действия солей тяжелых металлов с гипертермией подтверждают ранее выявленную закономерность обнаружения максимального синергического взаимодействия [1, 4–6] при одновременном примене-



**Рис. 4.** Зависимость коэффициента синергического усиления от действующей температуры после одновременного применения гипертермии с йодидом свинца(II)  $PbI_2$  (1 мг/мл) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток (а); зависимость коэффициента синергического усиления от концентрации раствора йодида свинца(II)  $PbI_2$  после его одновременного применения с ионизирующим излучением ( $^{60}Co$ , 10.8 Гр/мин) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток (б).

**Fig. 4.** The dependence of the synergistic enhancement ratio on the current temperature after the simultaneous use of hyperthermia with lead iodide  $PbI_2$  (1 mg/ml) on the survival of diploid yeast cells (a); dependence of the synergistic enhancement ratio on the concentration of the solution of lead iodide  $PbI_2$  after its simultaneous use with ionizing radiation ( $^{60}Co$ , 10.8 Gy/min) on the survival of diploid yeast cells (b).

нии гипертермии с различными физическими факторами окружающей среды – ионизирующие излучения, УФ-свет, ультразвук, неионизирующие электромагнитные излучения СВЧ диапазона. В этих же работах приводятся данные о синергическом взаимодействии некоторых лекарственных средств друг с другом, а также с гипертермией и ионизирующим излучением. Совокупность ранее опубликованных данных [1, 4–6] с результатами настоящей работы указывает на универсальность и важность проявления максимального синергического взаимодействия для различных аспектов практических приложений радиобиологии и экологии.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее была предложена математическая модель, качественно прогнозирующая отмеченные в данной работе закономерности синергического взаимодействия гипертермии с тяжелыми металлами [1, 3, 4]. В модели постулируется, что механизм взаимного усиления повреждений, индуцированных поражающими факторами, не связан с ингибированием процессов клеточного восстановления от повреждений ДНК. Выдвинута гипотеза, в соответствии с которой синергизм при комбинированных воздействиях обусловлен формированием дополнительных эффективных повреждений, возникающих за счет взаимодействия субповреждений, не эффективных при действии каждого агента в отдельности. Независимо от природы летальных

повреждений и сопровождающих их субповреждений, индуцируемых действующими агентами, модель прогнозирует, что максимальное значение коэффициента синергического усиления достигается при равенстве субповреждений от каждого агента.

Из результатов, представленных в данной работе, очевидно, что при постоянной концентрации солей тяжелых металлов с повышением действующей температуры эффективность синергического взаимодействия вначале возрастает, достигает максимума и затем уменьшается. Отсутствие синергического взаимодействия или его небольшое значение при сравнительно длительно действующих небольших температурах и постоянной концентрации солей тяжелых металлов означает относительно большое число химических субповреждений и малое число термических субповреждений, т.е. отсутствие равенства субповреждений, формируемых от каждого агента. Увеличение коэффициента синергического усиления с дальнейшим повышением действующей температуры обусловлено увеличением числа соответствующих термических субповреждений и постепенное снижение химических субповреждений. Максимальное значение коэффициента синергического усиления достигается при равенстве термических и химических субповреждений. Дальнейшее повышение действующей температуры приводит к снижению эффекта синергизма из-за уменьшения продолжительности одновременного применения факторов и соответствующим

шего снижения числа субповреждений, сформированных химическим агентом. При высоких температурах образуется большое число термических повреждений и соответствующих им субповреждений, т.е. условие достижения максимального синергизма снова нарушается и синергизм уменьшается вплоть до его полного отсутствия.

Существование оптимального соотношения доз воздействующих агентов и их интенсивностей, обеспечивающих максимум синергического взаимодействия, указывает на возможность учета синергизма в медицинской радиологии для достижения оптимального соотношения применяемых факторов, обеспечивающих максимальный коэффициент синергического усиления, а также на необходимость учета синергизма при экологическом нормировании безопасных уровней загрязнения окружающей среды поллютантами, в том числе и тяжелыми металлами.

Данная работа выполнена при сравнительно высоких температурах и концентрациях тяжелых металлов. Возникает вопрос, сохранится ли выявленная закономерность при малых концентрациях тяжелых металлов и меньших значениях действующей температуры. В нескольких наших предыдущих публикациях было показано, что чем меньше интенсивность одного из применяемых факторов, тем при меньшей интенсивности другого фактора достигается максимальный синергизм [5, 7, 11]. Такая закономерность указывает на принципиальную возможность существования оптимальной действующей температуры, обеспечивающей максимальное синергическое взаимодействие при малых концентрациях и интенсивностях вредных факторов, реально встречающихся в биосфере.

Результаты, полученные в данной работе, были качественно интерпретированы с помощью ранее описанной математической модели синергизма [1, 3, 4]. В предлагаемой модели синергизм обусловлен дополнительными эффективными повреждениями, возникающими в результате взаимодействия субповреждений, индуцированных обоими агентами. Модель не связана с молекулярной природой эффективных повреждений или субповреждений, которые упоминаются, механизм их взаимодействия еще предстоит выяснить. Более того, природа субповреждений и их взаимодействия может отличаться для различных биологических объектов и применяемых агентов. Однако полученные результаты характеризуют универсальную значимость закономерностей, выявленных в данной работе, и указывают на приемлемость идей рассматриваемой модели для дальнейшего анализа проблем синергизма в радиобиологии и экологии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Калужской области № 18-413-400004а(р), а также по Государственному контракту № Н.46.43.9Б.14.1053 и гранту Президента МК-872.2018.4 (контракт № 075-02-2018-570).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н.* Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере. М.: ГЕОС, 2012. 219 с. [*Petin V.G., Zhurakovskaya G.P., Komarova L.N.* Radiobiologicheskie osnovy sinergicheskikh vzaimodejstvij v biosfere. М.: GEOS, 2012. 219 s. (In Russian)]
2. *Петин В.Г., Морозов И.И.* Синергетика факторов окружающей среды. М.: ГЕОС, 2015. 248 с. [*Petin V.G., Morozov I.I.* Sinergetika faktorov okruzhayushchej sredy. М.: GEOS, 2015. 248 s. (In Russian)]
3. *Petin V.G., Komarov V.P.* Mathematical description of synergistic interaction of hyperthermia and ionizing radiation // *Math. Biosci.* 1997. V. 146. № 2. P. 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0025-5564\(97\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0025-5564(97)00078-3)
4. *Petin V.G., Kim J.K.* Synergistic Interaction and Cell Responses to Environmental Factors. N.Y.: Nova Science Publishers, 2016. 337 p.
5. *Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н., Рябова С.В.* Зависимость синергизма факторов окружающей среды от их интенсивности // *Экология.* 1998. Т. 29. № 5. С. 383–389. [*Petin V.G., Zhurakovskaya G.P., Komarova L.N., Ryabova S.V.* Zavisimost' sinergizma faktorov okruzhayushchej sredy ot ih intensivnosti // *Ekologiya.* 1998. Т. 29. № 5. С. 383–389. (In Russian)]
6. *Петин В.Г., Жураковская Г.П.* Закономерности проявления максимального синергического взаимодействия // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014. Т. 54. № 6. С. 589–596. [*Petin V.G., Zhurakovskaya G.P.* Zakonomernosti proyavleniya maksimal'nogo sinergicheskogo vzaimodejstviya // *Radiac. biologiya. Radioekologiya.* 2014. Т. 54. № 6. С. 589–596. (In Russian)] <https://doi.org/10.7868/S0869803114060101>
7. *Евстратова Е.С., Петин В.Г.* Биофизическая интерпретация зависимости синергизма от интенсивности применяемых агентов // *Биофизика.* 2018. Т. 63. № 6. С. 1186–1194. [*Evstratova E.S., Petin V.G.* Biofizicheskaya interpretaciya zavisimosti sinergizma ot intensivnosti primenyaemyh agentov // *Biofizika.* 2018. Т. 63. № 6. С. 1186–1194. (In Russian)] <https://doi.org/10.1134/S0006302918060182>
8. *Богдановский Г.А.* Химическая экология. М.: МГУ, 1994. 237 с. [*Bogdanovskij G.A.* Himicheskaya ekologiya. М.: MGU, 1994. 237 s. (In Russian)]
9. *Bica L., Meyerowitz J., Parker S.J. et al.* Cell cycle arrest in cultured neuroblastoma cells exposed to a bis(thiosemicarbazonato) metal complex // *Biometals.* 2011. V. 24. P. 117–133. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9380-7>
10. *Ceresa C., Bravin A., Cavaletti G. et al.* The combined therapeutic effect of metal-based drugs and radiation

- therapy: the present status of research // *Curr. Med. Chem.* V. 21. Issue 20. 2014. P. 2237–2265.  
<https://doi.org/10.2174/0929867321666140216125721>
11. *Evstratova E.S., Petin V.G., Zhurakovskaya G.P.* Synergistic effects and their potential significance for the influence of natural intensities of environmental factors on cell growth // *Synergy*. 2018. V. 6. № 1. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.synres.2017.12.001>
  12. *Eichholtz-Wirth H., Hietel B.* Heat sensitization to cisplatin in two cell lines with different drug sensitivities // *Int. J. Hyperthermia*. 1990. V. 6. № 1. P. 47–55.
  13. *Urano M., Kahn J., Majima H., Gerweck L.E.* The cytotoxic effect of cis-diamminedichloroplatinum (II) on cultured Chinese hamster ovary cells at elevated temperatures: Arrhenius plot analysis // *Int. J. Hyperthermia*. 1990. V. 6. № 3. P. 581–590.  
<https://doi.org/10.3109/02656739009140954>
  14. *Феллер В.* Введение в теорию вероятностей и ее приложения. М.: Мир, 1967. 484 с. [*Feller V.* *Vvedenie v teoriyu veroyatnostej i ee prilozheniya*. М.: Мир, 1967. 484 с. (In Russian)]
  15. *Васина М.В., Васин А.А., Манохин Е.В.* Теория вероятности и математическая статистика. М.: Прометей, 2018. 160 с. [*Vasina M.V., Vasin A.A., Manohin E.V.* *Teoriya veroyatnosti i matematicheskaya statistika*. М.: Прометей, 2018. 160 с. (In Russian)]
  16. *Белкина С.В., Воробей О.А., Жураковская Г.П.* Химическая сенсibilizация термического поражения эукариотических клеток. Свидетельство о государственной регистрации базы данных, охраняемой авторскими правами RUS 2019620924 от 16.05.2019. Официальный Бюл. РОСПАТЕНТ. 2019. № 6. С. 1. [*Belkina S.V., Vorobej O.A., Zhurakovskaya G.P.* *Himicheskaya sensibilizatsiya termicheskogo porazheniya eukarioticheskikh kletok*. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii bazy dannyh, ohranyaemoj avtorskimi pravami RUS 2019620924 ot 16.05.2019. Oficial'nyj Byulleten' ROSPATENT. 2019. № 6. S. 1. (In Russian)]

## Patterns of Synergic Interaction Display after Heavy Metals Combined with Hyperthermia or Ionizing Radiation

M. S. Tolgayeva<sup>a</sup>, A. N. Filimonova<sup>b</sup>, O. A. Vorobey<sup>a</sup>, E. S. Evstratova<sup>b,#</sup>, and V. G. Petin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia*

<sup>b</sup> *National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia*

<sup>#</sup> *E-mail: ekevs7240@mail.ru*

The objective of the study was to identify the general patterns of synergism display after simultaneous action of heavy metal salts with ionizing radiation or with hyperthermia. The objects of research were *Escherichia coli* bacteria (strain B/r) and diploid yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* (strain XS800), which were treated with chemical preparations containing salts of heavy metals (copper, platinum, lead, chromium, zinc) at the stationary stage of growth simultaneously with hyperthermia (37–60°C) or ionizing radiation ( $\gamma$ -rays <sup>60</sup>Co, dose rate 10.8 Gy/min). To demonstrate the generality of the revealed patterns, we used data on the inactivation of Chinese hamster cells (CHO) published by other authors. To quantify the degree of synergism, we used a synergistic enhancement ratio determined by the division of isoeffective doses on the theoretically expected and experimental dose-response curves. Experimental results related with cell survival and the synergistic interaction of the simultaneous application of heavy metal salts with ionizing radiation or hyperthermia are presented. The optimal parameters of acting agents that provide the highest synergistic interaction have been revealed. Any deviation of these parameters from the optimal value leads to a decrease in synergism. It is concluded on the existence of general pattern revealed, which does not depend on the nature of the acting agents, biological objects and tests. Possible mechanisms of the results obtained and directions of their practical application in radiobiology and ecology are discussed.

**Keywords:** ionizing radiation, heavy metals, hyperthermia, synergism, bacteria, yeast, mammalian cells

## НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 612.6:616-03:614.8:537.86

### ЗНАЧИМОСТЬ АДЕКВАТНОЙ ИНФОРМАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ОПАСНОСТИ ЭМП СОТОВОЙ СВЯЗИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ (первая четверть XXI века)

© 2020 г. Ю. Г. Григорьев<sup>1,2,3,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Российский комитет по защите от неионизирующего излучения, Москва, Россия

<sup>3</sup> Консультативный комитет ВОЗ по международной программе “ЭМП и здоровье населения”, Москва, Россия

\*E-mail: profgrig@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 24.03.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

В настоящее время проводится много исследований по оценке влияния на организм ЭМП сотовой связи. Однако эти результаты, как правило, не обобщаются, проводятся по критериям, зависящим от многих причин, не связанным с воздействием ЭМП, и не могут быть адекватной информацией для установления соответствующего риска, а поэтому не могут быть базовыми для установления нормативов. Рассматривается возможность определить значимые реперные направления и готовность их к определению понятия адекватной информации.

**Ключевые слова:** опасность ЭМП РЧ, стандарты, опухоли мозга, дети, антенатальное развитие, репродуктивная система, адекватная информация

**DOI:** 10.31857/S0869803120050045

Уже более 30 лет продолжается в мировом обществе дискуссия об опасности электромагнитных полей (ЭМП) для здоровья населения. На международном уровне во многих странах созданы официальные комитеты, форумы и общественные доверенные комитеты, научные альянсы и др. для решения этой проблемы. Например, созданы Консультативный комитет ВОЗ по Международной программе “ЭМП и здоровье населения”, Международная комиссия по защите от неионизирующего излучения (ICNIRP), рабочая группа “BioInitiative”, Международная комиссия по электромагнитной защите (ISEMS) и др. Более 20 лет работает Российский национальный комитет по защите от неионизирующих излучений (РНКЗНИ). Решения Комитета об опасности для населения, включая детей, разосланы ВОЗ во многие страны мира. На основе этих решений были разработаны в 2003 г. соответствующие рекомендации, представленные в СанПиН 2003 г. [1].

Однако до сих пор мы не имеем адекватной информации как основы для оценки риска воздействия ЭМП сотовой связи на здоровье населения.

Причинами отсутствия единой точки зрения на оценку опасности для населения ЭМП сотовой связи являются, с нашей точки зрения, заин-

тересованность соответствующей промышленности в получении отрицательных результатов. Как стало известно, промышленностью ангажируются многие ученые, которые проводят исследования по проблеме и занимают ведущие посты в некоторых авторитетных международных организациях. Кроме того, проводится много локальных исследований с попыткой получить второстепенный результат. Игнорируется понятие “критический орган” для данных условий воздействия ЭМП сотовой связи, например, головной мозг. Практически отсутствуют обобщения с адекватной информацией, позволяющей оценить степень риска для здоровья населения этого вида воздействия.

В данной публикации будут рассмотрены некоторые реперные направления исследования с позиции их адекватности для установления гармонизированной оценки риска.

С нашей точки зрения, наиболее приоритетными являются следующие направления: согласование нормативных уровней влияния ЭМП РЧ на головной мозг; влияние на периоды онтогенеза, оценка отдаленных последствий и, прежде всего, развитие онкологических заболеваний головного мозга, изменение различных психофизиологических показателей подрастающего по-

коления, в частности, когнитивных функций при постоянном использовании мобильных телефонов (МТ); влияние на репродуктивную и иммунную системы, изменение структуры ДНК и ряд других.

Далее более подробно будут рассмотрены те направления, которые являются профильными для автора.

### СТАНДАРТЫ ЭМП РЧ

Электромагнитные поля относятся к вредным видам излучения. Безопасность их воздействия на население зависит, прежде всего, от принятых стандартов. В СССР первые стандарты на электромагнитные поля радиочастотного диапазона (ЭМП РЧ) для населения были приняты в 1984 г. — 10 мкВт/см<sup>2</sup> [2]. В то время это были самые жесткие стандарты в мировой практике. В США стандарт был равен 1000 мкВт/см<sup>2</sup> [3]. Этот стандарт был принят Международным комитетом по электромагнитной безопасности и Международной комиссией по стандартам (ICNIRP). Однако с 2012 г. ситуация резко изменилась: на протяжении 17 лет страна за страной стали ужесточать стандарты ЭМП РЧ. На сегодня более 12 стран ввели в действие более жесткие нормативы, чем в России (Австрия, Италия, Канада, Бельгия, Китай, Испания, Бразилия, Болгария, Польша и др.). Разброс предельно допустимых уровней (ПДУ), используемых в различных странах в настоящее время, велик — от 0.006 до 1000 мкВт/см<sup>2</sup> [4]. В конце 2019 г. были представлены новые стандарты IEEE, но остались те же высокие ПДУ — 1000 мкВт/см<sup>2</sup> [5].

Можно заключить, что адекватных данных по этой проблеме нет, хотя хроническое многолетнее облучение ЭМП РЧ всего тела населения продолжается, прежде всего, за счет базовых станций (БС) и Wi-Fi.

К сожалению, ситуация еще более усугубляется в связи с массовым использованием населением, включая детей, МТ, при котором головной мозг непосредственно подвергается воздействию ЭМП РЧ. Поэтому, впервые за весь период цивилизации, головной мозг стал новым критическим органом воздействия, что влечет необходимость немедленного решения проблемы стандартизации воздействия ЭМП РЧ.

К сожалению, решение проблемы разработки новой стандартизации в данный период времени сталкивается со следующими препятствиями: отсутствием достаточной радиобиологической и гигиенической научной базы данных; малоадекватной информационностью по этой проблеме; нет научных обоснований ПДУ при воздействии ЭМП РЧ на “критичный орган” — головной мозг.

Таким образом, адекватная информация для оценки значимости опасности отсутствует.

### ДЕТИ И МОБИЛЬНЫЕ ТЕЛЕФОНЫ

Известно, что все современные гаджеты — источники ЭМП. Особое место в этом ряду занимают МТ, которые являются открытым и неконтролируемым источником ЭМИ радиочастотного диапазона. Впервые за всю историю цивилизации наши дети подносят этот источник ЭМП непосредственно к голове и подвергают облучению свой головной мозг [6–8]. Согласно пункту 6.9 СанПиН 2.1.8/2.2.4.1190-03, МТ не рекомендуется использовать детям до 18 лет.

Наше подрастающее поколение попадает в зону особого риска, что неоднократно отмечалось в решениях Российского Комитета по защите от неионизирующего излучения (РНКЗНИ) от 2001, 2004, 2007, 2008 и 2009 г. Тексты решений приведены в книге Ю.Г. Григорьева и Н.И. Хорсевой [9]. ВОЗ констатировала, что растущий организм на всех этапах своего развития **наиболее уязвим** к воздействию различных внешних факторов [10].

Научная общественность слишком далеко находится от решения проблемы оценки опасности облучения ЭМП РЧ мозга детей. Отсутствует как за рубежом, так и в России соответствующая научная радиобиологическая база для установления порогового безопасного уровня ЭМП РЧ при детальном многолетнем воздействии на мозг ребенка.

Проводимые отечественные исследования психофизиологических показателей детей и подростков — пользователей мобильной связью на протяжении 14 лет являются единственными в мире. Результаты этого уникального исследования опубликованы в книгах [9, 11] и более чем в 30 статьях.

Обобщенные результаты этих исследований на конец 2019 г. были представлены Н.И. Хорсевой на Всероссийской научной конференции “Актуальные вопросы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений” (Москва, ноябрь 2019) [12]. Проведенный анализ показал, что имеются статистически значимые ухудшения показателей сенсомоторных реакций, утомления, работоспособности, когнитивных функций:

— зарегистрировано увеличение времени простой слухо-моторной реакции (ПСМР) у детей-пользователей МТ по сравнению с контрольной группой и установлены закономерности их латеральных проявлений. Регистрации ипсил- или контралатеральных эффектов зависели от режима пользования МТ);

— впервые описаны эффекты увеличения числа нарушений фонематического восприятия и количества пропущенных сигналов, изменения

параметров воспроизведения заданного ритма и индивидуальной минуты;

- зарегистрировано увеличение времени простой зрительно-моторной реакции (ПЗМР) у детей-пользователей МТ по сравнению с контрольной группой; установлены однонаправленные изменения показателей простых ПСМР и РЗМР при увеличении длительности пользования МТ;

- было зарегистрировано увеличение показателя утомляемости в 39.7% случаев, причем в 30,3% случаев это увеличение было значительным. Показатели работоспособности снижались на 50.7%. Для детей и подростков 7–11-летнего возраста (1364 измерения) только у 8.5% уровень сформированности мелкой моторики руки находился в пределах возрастной нормы, что отражается на выполнении письменных работ, почерке детей и подростков и может быть связано с использованием сенсорных экранов в современных гаджетах;

- выявлен дисбаланс в уровне сформированности произвольного внимания (ПВ) и смысловой памяти (СП): высокий уровень развития ПВ выявлен у 41.03% детей и подростков против 33.6% для СП, а дисгармоничный – для 21% (ПВ) и 36.25% (СП). Данный факт может свидетельствовать о том, что параметры СП для детей – пользователей мобильной связи – снизились в большей степени, чем для параметров ПВ.

Кроме того, в Институте гигиены детей РАН начаты эпидемиологические исследования соматического здоровья детей [13, 14]. С 2011 г. РНКЗНИ принял пять решений об опасности ЭМП сотовой связи для детей, были проведены ряд симпозиумов и международных конференций.

Следует особо отметить, что до сих пор зарубежные ученые в своих исследованиях используют, как правило, методы опроса и анкетирования, в том числе путем почтовой переписки, анализ эпидемиологических данных, а также делаются выводы на основе изучения эффектов кратковременного воздействия МТ.

В 2017 г. в Рейкьявике состоялась Международная конференция “Children, Screen time and Wireless Radiation”, на которой ученые 27 стран подписали Петицию об опасности для детей использования беспроводной технологии в школах. Это обращение подписали ученые Швеции, Великобритании Австралии, Франции, России – всего из 27 стран и в том числе от России (автор этой статьи) [15].

Только в 2019 г. Роспотребнадзоры в сфере образования и науки, а также в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека выпустили методические рекомендации об использовании устройств мобильной связи в общеобразовательных организациях, признавая возможное негативное влияние ЭМП сотовой связи на здоровье детей.

Это эпохальное решение государственных структур [16]. 11 января 2020 г. Роспотребнадзор в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека повторно представил свои рекомендации родителям по безопасному использованию мобильного телефона, ограничивая время пользования МТ и увеличения расстояния между МТ и ушной раковиной ребенка [17]. Этим решением очередной раз на государственном уровне была признана опасность для здоровья детей ЭМП сотовой связи.

Однако, несмотря на все принятые решения, рекомендации, резолюции, до сих пор отсутствуют нормативы для детей, хотя поглощенная доза в мозге ребенка в 2 раза больше, чем у взрослого, и облучение широко распространяется на более чувствительные области мозга; при этом известно, что организм ребенка более уязвим к воздействию физических факторов внешней среды [6, 10]. Фактически дети всех стран участвуют в “глобальном эксперименте” с неопределенными результатами для их здоровья [18]. Наиболее жесткое мнение по этому поводу было высказано еще 2001 г. на рабочем совещании в ВОЗ: “Разрешение использовать сотовые телефоны маленькими детьми – преступление против человечества” (Markov, США) [19]. Поэтому приходится констатировать тот факт, что мы, к сожалению, находимся далеко от получения адекватной достоверной информации об опасности для детей ЭМП сотовой связи, хотя дети находятся в группе риска.

Тем не менее активному продвижению мер по безопасному использованию мобильных телефонов препятствует наличие финансового лобби промышленности, связанной с внедрением сотовой связи, пропагандирующее концепцию о полной безопасности для всех групп населения ЭМП сотовой связи, особенно для детей. Организован даже Мобильный промышленный форум (ММФ). Фонд этого лобби финансирует только исследования, где заранее предусмотрены желаемые отрицательные результаты. Например, ММФ опубликовал специальную брошюру под названием “Промышленный форум ММФ, точка зрения на проблему – мобильные телефоны и дети” [20], по мнению которого *“Существует сильная научная база для всех потребителей, вселяющая уверенность в безопасности мобильных телефонов”*. (*Mobil Manufactures Forum: “We believe that there is a strong scientific basis for all consumers to have confidence in the safety of mobile phones”*).

Более абсурдного вывода невозможно сформулировать, тем более, что никакой научной базы не существует, адекватные экспериментальные исследования в условиях хронического воздействия ЭМП РЧ на формирующийся мозг до сих пор не проводятся. Сложившаяся ситуация суще-

ственно тормозит исследования по проблеме и переводит ее в русло постоянных дискуссий.

И, наконец, практически отсутствуют обобщения результатов отечественных и зарубежных ученых, что существенно затрудняет согласование вывода о степени риска воздействия ЭМП РЧ на подрастающее поколение.

### **Мужская репродуктивная система и ЭМП сотовой связи**

В течение более двух десятилетий обсуждается проблема влияния ЭМП РЧ сотовой связи на репродуктивную функцию у мужчин. Важно, что нарушения функций репродуктивной системы (РС) имеют тенденцию к восстановлению. Однако до сих пор не установлено, с какой скоростью идет восстановление, не определен радиобиологический коэффициент остаточного поражения, т.е. значимость вклада кумулятивного эффекта.

Анализ литературных данных показал, что проведено большое число исследований на добровольцах и в эксперименте на животных. В частности, в монографии Г.Г. Верещако [21] дан подробный анализ результатов более 15 публикаций, выполненных в основном зарубежными исследователями на испытуемых-добровольцах. Однако до сих пор нет единой точки зрения о влиянии ЭМП сотовой связи на репродуктивную систему мужчин. Аналогичная ситуация сложилась и по результатам экспериментальных работ.

Тем не менее следует обратить особое внимание на исследования, проведенные в Беларуси. **В рамках Государственных программ научных исследований в Гомельском Институте радиобиологии НАН Беларуси на 2011–2020 гг. был проведен цикл исследований на белых крысах линии Вистар (общее число животных – 2000) с целью комплексной оценки морфофункциональных изменений в РС, в условиях воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения от мобильного телефона (897, 1745 МГц, ППЭ 0.2–20 мкВт/см<sup>2</sup>, различной продолжительности воздействия) на этапах антенатального и постнатального развития [21–28].** Эти исследования уже вошли в топ-10 результатов ученых НАН Беларуси за 2019 г.

Принимая во внимание тот факт, что репродуктивная система претерпевает значительные изменения с момента рождения животного и до состояния его половой зрелости, в первой серии экспериментов животных, начиная с 50–52-дневного возраста и до достижения ими возраста 140–142 дня, подвергали воздействию ЭМИ от МТ на частотах 897 и 1745 МГц. Комплексный анализ состояния РС самцов крыс проводили на 1-е, 7-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки.

Вторая серия экспериментов была посвящена изучению хронического влияния ЭМИ от МТ на

рождаемость и морфофункциональное состояние РС крыс-самцов в трех поколениях ( $F_1$ – $F_3$ ).

Третьим этапом исследований было изучение последствий воздействия ЭМИ от МТ (1745 МГц) на морфофункциональное состояние РС потомства крыс-самцов в возрасте 2 и 4 мес., рожденных от родителей, один из которых или оба были подвергнуты воздействию исследуемого фактора на протяжении 3 мес. их постнатального развития, начиная с возраста 50–52 дня.

В сыворотке крови определяли содержание тестостерона и кортикостерона. В ткани гипоталамуса проводили анализ нейромедиаторов. В клеточной суспензии, полученной из тестикулярной ткани, проводили количественный анализ различных типов сперматогенных клеток методом проточной цитометрии. Осуществлялся подсчет количества эпидидимальных сперматозоидов и их жизнеспособности, а также число апоптотических форм.

Результаты показали, что характер выявленных морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов, подвергнутых воздействию низкоинтенсивного ЭМИ от МТ, в значительной мере зависит от длительности экспозиции и возраста животных.

Так, воздействие ЭМИ от МТ на организм крыс-самцов в период их полового созревания приводит к наиболее значительным изменениям в развивающейся репродуктивной системе, характеризующимся увеличением массы эпидидимисов и семенных пузырьков, развитием изменений в процессе сперматогенеза, которые проявляются угнетением пролиферативной активности (снижение количества сперматогоний) и активацией дифференцировки клеток сперматогенного эпителия – сперматид, сопровождаемое значительным увеличением количества эпидидимальных сперматозоидов (раннее половое созревание), при снижении их жизнеспособности на фоне снижения концентрации тестостерона в сыворотке крови.

Установлено нарушение процессов синтеза стероидных гормонов, а также некоторых нейромедиаторов, которое можно объяснить чувствительностью рецепторов гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси к длительному воздействию низкоинтенсивного ЭМИ от МТ.

Хроническое воздействие ЭМИ от МТ (ежедневно, 8 ч/день) на организм крыс-самцов и самок в период их постнатального и антенатального периода, на протяжении трех поколений, приводит к падению рождаемости животных и изменению соотношения полов в сторону увеличения доли самцов. У крыс-самцов полученного потомства  $F_{1-3}$  в возрасте 2, 4 и 6 мес. выявлены изменения в состоянии репродуктивной системы, наиболее значительные в возрасте 2 мес.

Получены уникальные данные, которые характеризуют ЭМИ от МТ как фактор, способный вызывать отдаленные (трансгенерационные) изменения в морфофункциональном состоянии РС поколения крыс-самцов, рожденных от родителей, подвергавшихся воздействию исследуемого фактора на протяжении их постнатального развития. Данные изменения проявляются в нарушении нормального функционирования сперматогенного эпителия, а именно, имела место интенсификация начального этапа сперматогенеза при значительном его угнетении на стадии трансформации сперматид. Установлено снижение количества зрелых половых клеток – сперматозоидов и выраженное ухудшение их жизнеспособности, а также усиление секреции тестостерона.

Комплекс выявленных нарушений в морфофункциональном состоянии РС крыс-самцов свидетельствует об угнетении ее функции в условиях воздействия низкоинтенсивного ЭМИ от МТ, что может реально влиять на снижение мужской фертильности. Отмеченные нарушения зависели от длительности экспозиции и возраста животных.

Таким образом, на основании уже имеющихся результатов мы можем заключить, что репродуктивная система может быть отнесена к значимой высокочувствительной системе. Однако остается необходимость повторения подобных исследований в других независимых научных центрах.

Отсутствие обобщений всех результатов по этой проблеме не дает право сделать вывод об адекватности полученных результатов для оценки опасности ЭМП сотовой связи для репродуктивной способности мужчин.

## ОПУХОЛИ МОЗГА И СОТОВАЯ СВЯЗЬ. ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

По нашему мнению, объективным критерием для оценки неблагоприятного действия ЭМП РС на население является факт развития опухолей мозга у пользователей МТ как проявление отдаленных последствий.

Эта патология мало связана с факторами внешней среды, и отклонение от существующих показателей развития рака мозга у населения может быть коррелировано с использованием МТ. По этой проблеме имеется явный прогресс.

Международное агентство исследования рака (IARC) при Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мае 2011 г. на основе рассмотрения результатов экспериментальных и эпидемиологических исследований сделало официальное сообщение для печати, в котором *классифицировало радиочастотные электромагнитные поля как возможно канцерогенный фактор для населения*

*(Группа 2В), что связано с использованием мобильного телефона.* Это решение было основано на увеличенном риске развития рака мозга – глиомы высокой злокачественности [29]. IARC особо отметило, что данное решение имеет большое значение для здравоохранения, особенно для пользователей МТ, поскольку число пользователей имеет тенденцию к постоянному росту, особенно среди молодежи и детей. В пресс-релизе указано, что подробное исследование полученных материалов до 2004 г. показало, что на 40% может увеличиться риск развития опухоли мозга (глиомы) при “тяжелом” использовании МТ: в среднем по 30 мин в день на протяжении свыше 10 лет. Следует отметить, что в принятии этого решения принимал участие 31 ученый из 14 стран. В течение последующего месяца было дополнительно опубликовано обоснование решения IARC [30]. Между тем на заседаниях Консультативного Комитета ВОЗ по Международной Программе “ЭМП и здоровье населения” в 2011 и 2012 г. большинством голосов активно формировалось мнение, что не имеется достаточных данных у IARC для этого решения.

Тем не менее группа шведских ученых во главе с L. Hardell провела комплекс эпидемиологических исследований в течение более чем 15 лет по развитию опухолей мозга у пользователей МТ. Авторы выявили увеличение риска развития опухолей мозга у пользователей МТ с “периодом ожидания” 10 лет с риском от 1.3 до 1.8. Были отмечены увеличенные риски развития астроцитомы и акустической невромы на ипсилатеральной стороне мозга. Риск развития мозговых опухолей увеличивался до 5 раз у людей, которые начали использовать МТ в детском возрасте, а именно 8–10 лет. Развитие опухоли зависело от продолжительности использования МТ [31–33]. Проведенные исследования шведских ученых подтвердили увеличенный риск для мозговых опухолей при использовании мобильных и бесшнуровых телефонов.

В начале 2016 г. было опубликовано сообщение о статистических данных, полученных в США на основе материалов Национального Института Рака (NCI), Национальной Программы регистрации рака (NPCR) и Эпидемиологической программы наблюдения (SER) за период 2008–2012 гг. Заключение было сделано относительно увеличения риска развития опухолей мозга у населения США различных возрастных групп в течение периода 2000–2010 гг. Авторы этих материалов полагают, что увеличение частоты мозговых опухолей было значимо и связано с использованием населением мобильной связи [34]. А в 2018 г. опубликованы уже данные ученых Великобритании – регистр UK National of National Statistics (ONS) о повышении темпа роста злокачественного рака головного мозга у населения Ан-

глии с 1995 по 2014 г., особенно в лобных и височных долях [35]. Исследование выявило устойчивое и статистически высокозначимое увеличение частоты мультиформной глиобластомы (GBM) для всех возрастов. Уровень развития GBM удвоился с 2.4 до 5.0 на 100 000 человек. В 1995 г. количество злокачественных опухолей лобных или височных долей головного мозга составляло 41%, а к 2015 г. было установлено 60% опухолей GBM. По итогам этого регистра сделан вывод: “Наиболее убедительным объяснением роста заболеваемости от этих смертельных опухолей головного мозга, особенно в лобных и височных долях, могут быть длительные воздействия микроволнового излучения мобильных телефонов”.

Тем не менее, несмотря на опубликованные результаты лонгитюдных наблюдений, очень важными для подтверждения возможного развития этой патологии являются классические радиобиологические эксперименты на животных.

Так, в 2016 г. было сообщено о результатах крупномасштабного эксперимента, проведенного в США по Национальной программе токсикологии (Micro-wave News, May 2016; <http://bit.ly/WSJsaferemr>). Эксперимент был выполнен Национальным институтом исследования здоровья окружающей среды (NIEHS). Эта программа финансировалась правительством США, стоимость этого эксперимента составило 25 млн долларов [36]. Крыс 2 года облучали ЭМП РЧ по 10 мин с 10-минутным перерывом в течение 18 ч в день. В качестве облучателей использовали два стандарта сотовой связи GSM и CDMA. Частота сигналов ЭМП была равна 900 МГц. Было четыре группы крыс: три опытные по 180 шт. и одна группа – “ложный контроль” – 90 крыс. Было выбрано три величины малой нетепловой интенсивности SAR 1.5; 3 и 6 Вт/кг, которые не вызывали нагрев тканей, т.е. исключали так называемый тепловой эффект.

Это исследование показало статистически значимое увеличение частоты развития рака среди опытных крыс в течение 2-летнего облучения (опухоли развились у 30 из 540 крыс). В дальнейшем более детальное рассмотрение результатов было продолжено [37]. Полученные результаты показали, что нетепловые уровни ЭМП РЧ могут быть причиной развития опухолей в мозгу. Это заключение противоречит рекомендациям INCRIP, которые рекомендуют допустимый уровень поглощенной дозы SAR для МТ 2.0 Вт/кг. Таким образом, результаты уникального 2-летнего эксперимента увеличили надежность глобального заключения относительно значимого риска развития опухолей мозга у населения пользователей МТ.

Наконец, в 2018 г. был опубликован отчет о развитии опухолей головного мозга и сердца у крыс, подвергавшихся облучению ЭМП в течение всей своей жизни. Животные находились в радиочастотном поле МТ GSM с частотой 1.8 ГГц

[38]. Исследование было выполнено в институте Рамаззини (Италия). Необходимо отметить, что Институт Рамаззини с 1971 г. занимается изучением токсического воздействия химических веществ и физических факторов, и в том числе электромагнитных полей 50 Гц (высоковольтные опоры) и радиочастотного диапазона. В этом исследовании 2448 самцов и самок крыс подвергли действию радиации сотового телефона 19 ч. в день от перинатального периода до естественной смерти. **Экспозиции были гораздо ниже, чем в исследовании NTP. Значения SAR в этом исследовании варьировались от 0.001 до 0.1 Вт/кг по сравнению с 1.5 до 6.0 Вт/кг в исследовании NTP США. Эти уровни воздействия находились в самых нижних пределах текущих стандартов при воздействии на головной мозг. Интенсивность излучения МТ в данном исследовании соответствовала той, что можно получить от ближайшей базовой станции.**

Несмотря на эти различия в уровнях облучения, оба исследования выявили статистически значимое увеличение риска развития злокачественных опухолей одного и того же типа schwannoma и в мозге у самок, и в сердце у самцов крыс при их тотальном облучении.

Предшествующие исследования также свидетельствовали, что долгосрочное использование сотового телефона может привести к повышенным рискам развития вестибулярной шванномы, акустической невриномы слухового нерва, возникающей из клеток Шванна, но в отличие от своего аналога в сердце, это обычно медленно растущая опухоль и не злокачественная.

L. Hardel в 2018 г. с учетом результатов этих двух экспериментов предложил модернизировать классификацию IARC и перевести ЭМП РЧ в Группу 1, “как реальный канцероген для населения” [39].

После завершения двух крупных исследований – Национальной программой токсикологии в США и Институтом Рамаззини в Италии – многие ученые считают, что теперь есть “явные доказательства” того, что радиационное облучение сотового телефона может вызывать рак мозга. Российские ученые солидарны с этим решением [40].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не представляется возможным оценить значимость многих радиобиологических исследований в оценке риска ЭМП РЧ сотовой связи. Однако если учесть, что процесс исследования идет уже более 20 лет, накоплен огромный материал, мировая научная общественность просто обязана оценить риски. Существующая ситуация с элементами анархии может трактоваться как эксперимент над населением с пассивным ожиданием развития четкой патологии.

К сожалению, до сих пор нет международной экспертной оценки всех полученных результатов.

Мы находимся далеко от получения адекватной информации для реализации возможности оценить риски.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. СанПиН 2.1.8/2.2.4.1190–03 в 2003 г. Гигиенические требования к размещению и эксплуатации средств сухопутной подвижной радиосвязи. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 13 марта 2003 года. [Sanitary and epidemiological rules and regulations SanPiN 2.1.8 / 2.2.4.1190-03. Hygienic requirements for the placement and operation of land mobile radio communications. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of March 13, 2003. (In Russian)]
2. СН №2663-84, 1984. Временные санитарные нормы и правила защиты населения от воздействия электромагнитных полей, создаваемых радиотехническими объектами, 1984. [SN № 2663-84, 1984. Temporary sanitary standards and rules for protecting the population from exposure to electromagnetic fields created by radio engineering objects, 1984. (In Russian)]
3. ICNIRP (1998). International Commission on Non-Ionizing radiation Protection, Guidelines for limiting exposure to time varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz) // Health Physics. 2002. V. 74. № 4. P. 494–522.
4. Grigoriev Yu.G. Chapter 9. Radiobiological Arguments for Assessing the Electromagnetic Hazard to Public Health for the Beginning of the Twenty-First Century: The Opinion of the Russian Scientist in book Mobile Communications and Public Health Edited by Marko Markov, Taylor & Francis Group, LLC, 2019, P. 223–236.
5. IEEE International Committee on Electromagnetic Safety. Safety Levels with Respect to Human Exposure to Electric, Magnetic, and Electromagnetic Fields, up to 300 GHz. IEEE Std C95.1–2019.
6. Ghandhi O., Kang G. Some present problems and a proposed experimental phantom for SAR compliant testing of cellular telephones at 835 and 1900MHz // Phys. Med. Biol. 2002. № 47. P. 1501–1518.
7. Григорьев Ю.Г. Электромагнитные поля сотовых телефонов и здоровье детей: что ожидает наших детей в ближайшей и долгосрочной перспективе? // Сотовая связь и здоровье: медико-биологические и социальные аспекты: Мат. Междунар. науч.-практ. Конф., 20–22 сентября 2004 г. М., 2004. С. 12–65. [Grigoryev Yu.G. The electromagnetic fields of cell phones and children's health: what awaits our children in the near and long term? // Cellular communication and health: biomedical and social aspects: Materials of the International scientific-practical conference, September 20–22, 2004. M., 2004. P. 12–65. (In Russian)]
8. Григорьев Ю.Г. Электромагнитные поля сотовых телефонов и здоровье детей и подростков (Ситуация, требующая принятия неотложных мер) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45. № 4. С. 442–450. [Grigoryev Yu.G. Electromagnetic fields of cell phones and the health of children and adolescents (A situation requiring urgent measures) // Radiation biology. Radioecology. 2005. V. 45. № 4. P. 442–450. (In Russian)]
9. Григорьев Ю.Г., Хорсева Н.И. Мобильная связь и здоровье детей. Оценка опасности применения мобильной связи детьми и подростками. Рекомендации детям и родителям. М.: Экономика, 2014. 230 с. [Grigoryev Yu.G., Khorseva N.I. Mobile communications and children's health. Hazard assessment of the use of mobile communications by children and adolescents. Recommendations for children and parents. M.: Economics, 2014. 230 p. (In Russian)]
10. WHO. Healthy environments for children. Backgrounder № 3, 2003.
11. Chapter 10. A Longitudinal Study of Psychophysiological Indicators in Pupils Users of Mobile Communications in Russia (2006–2017). Children Are in the Group of Risk in book Mobile Communications and Public Health Edited by Marko Markov 2019. Taylor & Francis Group, LLC, 2019. P. 237–253.
12. Хорсева Н.И., Григорьев Ю.Г., Григорьев П.Е. Оценка опасности ЭМП мобильных телефонов для детей и подростков. Итоги единственного в мире 14-летнего психофизиологического исследования. Актуальные вопросы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений // Сб. докл. Всерос. науч. конф., Москва, 12–13 ноября 2019 г. М.: Российский национальный комитет по защите от неионизирующих излучений, 2019. ISBN 978-5-6041530-0-0. С. 148–151. [Khorseva N.I., Grigoriev Yu.G., Grigoriev P.E. Hazard assessment of electromagnetic fields of mobile phones for children and teenagers. The results of the world's only lasted 14-years physiological studies: Materials of the III International Forum of the Scientific Council of the Russian Federation on Ecology and Environmental Health. "Modern problems of assessing, forecasting and managing environmental risks to public health and the environment, ways to rationally solve them." M., 2018, P. 148–151. (In Russian)]
13. Вятлева О.А., Курганский А.М. Мобильные телефоны и здоровье детей 6–8 лет: значение временных режимов и интенсивность излучения // Здоровье населения и среда обитания. 2017. № 8. С. 27–30. [Vyatleva O.A., Kurgansky A.M. Mobile phones and the health of children 6–8 years old: the importance of time modes and radiation intensity // Public Health and Habitat. 2017. № 8. P. 27–30. (In Russian)]
14. Вятлева О.А., Курганский А.М. Оценка влияния режимов использования мобильных телефонов с учетом интенсивности их излучения на самочувствие современных младших школьников: Мат. III Междунар. форума Научного совета РФ по экологии и гигиене окружающей среды "Современные проблемы оценки, прогноза и управления экологическими рисками здоровью населения и окружающей среды, пути их рационального решения". М., 2018. С. 68–69. [Vyatleva O.A., Kurgan A.M. Assessing the impact of the use of mobile phones, taking into account the intensity of their radiation on the health of modern elementary school students: Materials of the III International Forum of the Scientific Council of the Russian Federation on Ecology and Environmental Health "Modern problems of assessing, forecasting and managing environmental risks to public

- health and the environment, ways to rationally solve them". М., 2018. P. 68–69. (In Russian)]
15. Petition. International Conference "Children, Screen time and Wireless Radiation". Reykjavik, February 24, 2017.
  16. Методические рекомендации об использовании устройств мобильной связи в общеобразовательных организациях. Федеральные службы по надзору в сфере защиты потребителей и в сфере образования и науки, от 14 августа 2019, № МР 2.4.0150-19 и 01-230/13-01, 2019. 6 с. [Methodological recommendations on the use of mobile communication devices in educational institutions. Federal supervision services in the field of consumer protection and in the field of education and science, dated August 14, 2019, № МР 2.4.0150-19 and 01-230/13-01, 2019. 6 p. (In Russian)]
  17. Роспотребнадзор. О рекомендациях родителям по безопасному использованию мобильного телефона. 10.01.2020 г. [электронная версия]. Режим доступа [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php ELEMENT\\_ID=13](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php ELEMENT_ID=13). [Rospotrebnadzor. About recommendations for parents on the safe use of a mobile phone. 01/10/2020 [electronic version]. Access mode [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php ELEMENT\\_ID=13](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php ELEMENT_ID=13) (In Russian)]
  18. Григорьев Ю.Г. Мобильная связь и электромагнитный хаос в оценке опасности для здоровья населения. Кто несет ответственность? // Радиация и радиация. Радиозэкология. 2018. Т. 58. № 6. С. 633–645. [Grigoryev Yu.G. Mobile communications and electromagnetic chaos in assessing the danger to public health. Who is responsible? // Radiation Biology. Radioecology. 2018. V. 58. № 6. P. 633–645. (In Russian)]
  19. Markov M.S. Electromagnetic fields in the biosphere: advantages and dangers // Мед. радиология и радиация. безопасность. 2018. Т. 63. № 4. С. 63–75. [Markov M.S. Electromagnetic fields in the biosphere: advantages and dangers // Medical radiology and radiation safety. 2018. V. 63. № 4. P. 63–75. (In Russian)]
  20. ММФ. View point, mobile phones and children, January 2008. 18 p.
  21. Верещачко Г.Г. Влияние электромагнитного излучения мобильных телефонов на состояние мужской репродуктивной системы и потомства Минск: Белорусская наука, 2015. 183 с. [Vereshchako G.G. The effect of electromagnetic radiation from mobile phones on the state of the male reproductive system and offspring. Minsk: Belarusian Science, 2015. 183 p. (In Russian)]
  22. Верещачко Г.Г., Чуешова Н.В., Горох Г.А., Наумов А.Д. Состояние репродуктивной системы крыс-самцов первого поколения, полученных от облученных родителей и подвергнутых воздействию ЭМИ (897 МГц) в период эмбриогенеза и постнатального развития // Радиация. биология. Радиозэкология. 2014. Т. 54. № 2. С. 186–192. [Vereshchako G.G., Chueshova N.V., Gorokh G.A., Naumov A.D. The state of the reproductive system of male rats of the first generation, obtained from irradiated parents and exposed to electromagnetic radiation (897 MHz) during embryogenesis and postnatal development // Radiation Biology. Radioecology. 2014. V. 54. № 2. P. 186–192. (In Russian)]
  23. Верещачко Г.Г., Чуешова Н.В. Реакция органов репродуктивной системы и эпидидимальных сперматозоидов крыс на электромагнитное излучение от мобильного телефона (1800 МГц) различной продолжительности // Радиация. биология. Радиозэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 71–76. [Vereshchako G.G., Chueshova N.V. The reaction of the organs of the reproductive system and epididymal sperm of rats to electromagnetic radiation from a mobile phone (1800 MHz) of various durations // Radiation Biology. Radioecology. 2017. T. 57. № 1. P. 71–76. (In Russian)]
  24. Григорьев Ю.Г., Чуешова Н.В., Верещачко Г.Г. Состояние репродуктивной системы крыс-самцов в ряду поколений, полученных от облученных родителей и подвергнутых электромагнитному воздействию от мобильного телефона (1745 МГц) // Мед. радиология и радиация. безопасность. 2018. Т. 63. № 5. С. 33–40. [Grigoryev Yu.G., Chueshova N.V., Vereshchako G.G. The state of the reproductive system of male rats in a series of generations received from irradiated parents and subjected to electromagnetic effects from a mobile phone (1745 MHz) // Medical Radiology and Radiation Safety. 2018. V. 63. № 5. P. 33–40. (In Russian)]
  25. Чуешова Н.В., Висмонт Ф.И., Чешик И.А. Последствия длительного воздействия электромагнитного излучения частоты мобильного телефона (1745 МГц) на морфофункциональное состояние репродуктивной системы крыс-самцов и их потомство // Докл. нац. акад. наук Беларуси. 2019. Т. 63. № 2. С. 198–203. [Chueshova N.V., Wismont F.I., Cheshik I.A. Consequences of the prolonged exposure to electromagnetic radiation of a mobile phone frequency (1745 MHz) on the morphofunctional state of the reproductive system of male rats and their offspring // Dokl. Acad. Sciences of Belarus. 2019. V. 63. № 2. P. 198–203. (In Russian)]
  26. Чуешова Н.В., Висмонт Ф.И., Чешик И.А. Влияние электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц) на состояние репродуктивной системы крыс-самцов в период их постнатального развития. // Весн. нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. 2019. Т. 16. № 2. С. 216–225. [Chueshova N.V., Wismont F.I., Cheshik I.A. The influence of electromagnetic radiation from a mobile phone (1745 MHz) on the state of the reproductive system of male rats during their postnatal development // Weight. Nat. Acad. Navuk Belarusi. Ser. honey. Navuk. 2019. V. 16. № 2. P. 216–225. (In Russian)]
  27. Чуешова Н.В. Репродуктивная система как критерий оценки опасности электромагнитного излучения от мобильного телефона // Актуальные вопросы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений: Сб. докла. Всерос. науч. конф., Москва, 12–13 ноября 2019 г. М.: Российский национальный комитет по защите от неионизирующих излучений. 2019. С. 38–41. ISBN 978-5-6041530-0-0. [Chueshova N.V. Reproductive system as a criterion for hazard assessment electromagnetic radiation from mobile phone // Modern problems of assessing, forecasting and managing environmental risks to public health and the environment, ways to rationally solve them: Materials of the III International Forum of the Scientific Council of the Russian Federation on Ecology and Environmental Health. М., 2018. P. 38–41. (In Russian)]

28. Чуешова Н.В., Новиков Р.И., Козлов А.Е., Шубинов Е.В. Эффекты длительного воздействия электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц) на организм крыс-самцов // Актуальные вопросы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений: Сб. докл. Всерос. науч. конф., Москва, 12–13 ноября 2019 г. М.: Российский национальный комитет по защите от неионизирующих излучений, 2019. С. 41–43. ISBN 978-5-6041530-0-0. [Chueshova N.V., Novikov R.I., Kozlov A.E., Shubenok E.A. Long-term effects of electromagnetic radiation from mobile phone (1745 MHz) to the organism rats-males // Modern problems of assessing, forecasting and managing environmental risks to public health and the environment, ways to rationally solve them: Materials of the III International Forum of the Scientific Council of the Russian Federation on Ecology and Environmental Health. М., 2018. P. 41–43. (In Russian)]
29. IARC /A/ WHO. Classifies Radiofrequency Electromagnetic Fields as Possibly Carcinogenic to Humans. PRESS RELEASE № 208, 31 May 2011. 3 p.
30. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Non-Ionizing Radiation, Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields. V. 102. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol102/mono102.pdf>
31. Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Hansson Mild K. Pooled analysis of case-control studies on acoustic neuroma diagnosed 1997–2003 and 2007–2009 and use of mobile and cordless phones // *Int. J. Oncol.* 2013. V. 43. № 4. P. 1036–1044.
32. Hardell L., Carlberg M. Mobile phone and cordless phone use and the risk for glioma. Analysis of pooled case-control studies in Sweden, 1997–2003 and 2007–2009 // *Pathophysiology*. 2015. V. 22. № 1. P. 1–13.
33. Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Hansson Mild K. Pooled analysis of case-control studies on acoustic neuroma diagnosed 1997–2003 and 2007–2009 and use of mobile and cordless phones // *Int. J. Oncol.* 2013. V. 43. № 4. P. 1036–1044.
34. Statistical Report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012 // *Neuro Oncol.* 2015. Oct. 17. Suppl.
35. Register UK National of National Statistics (ONS. Study: Rates of Aggressive Brain Cancer Increasing in England, 2018. URL: <http://www.saferemr.com/2018/03/brain-tumor-incidence-trends.html>
36. Wyde M., Cesta M., Blystone C. et al. Report of Partial Findings from the National Toxicology Program Carcinogenesis Studies of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Hsd: Sprague Dawley® SD rats (Whole Body Exposures). Draft 5-19-2016. US National Toxicology Program (NTP), 2016. URL: <https://doi.org/10.1101/055699>
37. Smith-Roe S., Wyde M., Stout M. et al. Evaluation of the genotoxicity of cell phone radiofrequency radiation in male and female rats and mice following subchronic exposure // Environmental Mutagenesis and Genomics Society Annual Conference. Raleigh, NC, USA, 2017. Sept 9–13. <https://doi.org/10.1002/em.22343>
38. Falcioni L., Bua L., Tibaldi E., Lauriola M. et al. Report of final results regarding brain and heart tumors in Sprague-Dawley rats exposed from prenatal life until natural death to mobile phone radiofrequency field representative of a 1.8 GHz GSM base station environmental emission // *Environ. Res.* 2018. № 165. P. 496–503. URL: <https://www.mainecoalitiontostopsmartmeters.org/wp-content/uploads/2018/03/Belpoggi-Heart-and-Brain-Tumors-Base-Station-2018.pdf> (дата обращения 10.10.2019) <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.037>
39. Hardell L., Carlberg M. Comments on the US National Toxicology Program technical reports on toxicology and carcinogenesis study in rats exposed to whole-body radiofrequency radiation at 900 MHz and in mice exposed to whole-body radiofrequency radiation at 1.900 MHz // *Int. J. Oncology*. 2018. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4606>
40. Григорьев Ю.Г. Возможность развития опухолей мозга у пользователей сотовыми телефонами (научная информация к решению Международного Агентства по исследованию (IARC) от 31 мая 2011 г.) // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011. Т. 51. № 5. С. 633–638. [Grigoryev Yu.G. The possibility of developing brain tumors in users of cell phones (scientific information to the decision of the International Agency for Research (IARC) of May 31, 2011) // *Radiation Biology. Radioecology*. 2011. V. 51. № 5. P. 633–638 (In Russian)]

## Significance of Adequate Information about the Danger of Cellular Connection for Health of Population in the XXI Century

Yu. G. Grigoriev<sup>a,b,c,#</sup>

<sup>a</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical and Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>b</sup> Russian Committee for Protection Against Non-ionizing Radiation, Moscow, Russia

<sup>c</sup> WHO Advisory Committee on the International Program “EMF and Public Health”, Moscow, Russia

<sup>#</sup> E-mail: [profgrig@gmail.com](mailto:profgrig@gmail.com)

Currently, a lot of research is underway to assess the impact on the body of EMF cellular communications. However, these results, as a rule, are not generalized, are carried out according to criteria depending on many reasons that are not related to the effects of EMF and cannot be adequate information to establish the corresponding risk. It cannot be basic for setting standards. The possibility of determining significant benchmarks and their readiness to determine the concept of adequate information is being considered.

**Keywords:** EM PR risk, standards, brain tumors, children, antenatal development, reproductive system in men, adequate an information

УДК 621.039.5:574

## РАНЖИРОВАНИЕ РЕАКТОРНЫХ УСТАНОВОК НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРИРОДНУЮ СРЕДУ

© 2020 г. С. И. Спиридонов<sup>1,\*</sup>, Р. А. Микаилова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия*

*\*E-mail: spiridonov.si@gmail.com*

Поступила в редакцию 22.10.2019 г.

После доработки 27.03.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Представлен методический подход к сравнительной оценке реакторных установок и других ядерно-энергетических объектов с точки зрения потенциального воздействия аварийных выбросов на природную среду. Подход основан на расчете радиоэкологического риска с учетом вероятностей реализации постулируемых аварий и параметров радиоактивных выбросов для совокупности аварийных сценариев. В качестве референтного природного сообщества рассматривается древесный ярус соснового леса. Для характеристики последствий радиоактивных выпадений применен индекс радиационного воздействия. Рассчитаны значения риска для ряда российских (ВВЭР-1000, ВВЭР-1200) и зарубежных (PWR-890, BWR-1412, EPR-1600) реакторных установок и выполнено их радиоэкологическое ранжирование. Установлено, что наиболее безопасным для биоты является реактор нового поколения ВВЭР-1200.

**Ключевые слова:** реакторные установки, природная среда, аварийные сценарии, радиоэкологическая оценка, дозы облучения, древесный ярус леса

**DOI:** 10.31857/S0869803120050082

В настоящее время в мире эксплуатируется свыше 450 реакторных установок различного типа и строится 55 реакторов [1]. При формировании стратегий развития ядерной энергетики большое внимание уделяется разработке новых технологий и выбору оптимальных технологических решений. В качестве основного критерия выбора рассматривается удельная стоимость электроэнергии, вырабатываемая одним энергоблоком [2]. Этот экономический показатель используется для подтверждения конкурентоспособности ядерной энергетики в сравнении с альтернативными способами производства энергии. Кроме экономических оценок, неотъемлемой составляющей комплекса работ по созданию атомных станций является обоснование их радиационной и экологической безопасности [3]. Более того, при выработке направлений развития ядерной энергетики необходимо учитывать результаты интегральной радиоэкологической оценки ядерно-энергетических систем [4].

При условии соблюдения радиационных нормативов и квот на облучение населения штатное функционирование АЭС является, согласно современным представлениям, безопасным для населения и биоты [5, 6]. В то же время реакторные

установки и другие объекты ядерного топливного цикла являются потенциальными источниками радиоактивных выбросов в случае нештатных и аварийных ситуаций. По данным МЧС России, за период развития ядерной энергетики, кроме крупных радиационных аварий (Чернобыльская АЭС, японская АЭС “Фукусима” и т.д.), зарегистрировано около 300 радиационных инцидентов и аварий. Большинство из них не привело к поступлению радионуклидов в окружающую среду и не повлияло на радиационную обстановку в глобальном плане. Тем не менее существует вероятность аварий различной степени тяжести, оцениваемая очень малыми величинами. Согласно классификации МАГАТЭ, радиационные аварии выделяются в отдельную группу, наряду с плановыми и существующими радиоэкологическими ситуациями [7].

Полновесное обоснование экологической безопасности АЭС на этапе их планирования и разработки включает оценку последствий постулируемых аварий [8, 9]. При выполнении таких оценок необходимо уделять серьезное внимание не только человеку, но и биоте. В документах авторитетных международных организаций говорится о необходимости подтверждать, а не исходить

из предположения о защищенности окружающей среды [7]. Российский федеральный закон “Об охране окружающей среды” № 7 ФЗ от 10.01.2002 (с изменениями, вступившими в силу 01.01.2013) включает положение об обеспечении устойчивого функционирования экосистем при проектировании объектов использования атомной энергии.

Цель работы, результаты которой изложены в настоящей статье, — разработка и апробация подхода к сравнительной радиоэкологической оценке ядерно-энергетических объектов с точки зрения потенциального воздействия аварийных выбросов на биоту.

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

### *Аварийные сценарии и период оценки*

На этапе планирования АЭС и других объектов ядерной энергетики, являющихся потенциальными источниками радиоактивных выбросов, разрабатываются сценарии проектных и запроектных аварий. Совокупность сценариев может охватывать аварии различной степени тяжести, в том числе и крупные, согласно международной классификации. Так, для АЭС с реактором с водой под давлением PWR мощностью 890 МВт (АЭС “Сарри”, США), кипящим водяным реактором BWR, мощностью 1412 МВт (АЭС “Пич-Боттом”, США) описаны ситуации, которые можно охарактеризовать как аварии 7-го уровня по шкале INES [10, 11]. Крупные аварии такого же уровня рассматриваются для реактора под давлением третьего поколения EPR мощностью 1600 МВт (АЭС “Хинкли”, Великобритания), находящегося на стадии строительства [12]. При разработке аварийных сценариев в качестве исходных событий рассматривались сейсмические воздействия, падение самолета, ударные волны и т.д.

В результате аварийных выбросов природные экосистемы подвергаются в начальный период острому радиационному воздействию, а в дальнейшем — хроническому облучению. Следует отметить важность оценок для первого послеварийного периода, поскольку острое радиационное воздействие может вызвать серьезное нарушение природных сообществ. Изменение структуры и функционирования экосистем происходит не только в результате прямого действия радиационного фактора, но и вследствие совокупности вторичных пострадиационных эффектов и восстановительных процессов [13, 14].

### *Референтное природное сообщество*

Среди природных объектов наиболее уязвимыми по отношению к радиоактивному загрязнению являются лесные экосистемы вследствие высокой радиочувствительности древесных расте-

ний (особенно хвойных), их повышенной способности задерживать поступающие из атмосферы радионуклиды и медленно самоочищаться от них [15, 16]. При тяжелых радиационных авариях именно лесные экосистемы подвергались сильному лучевому поражению [17]. Так, после аварии на Чернобыльской АЭС площадь полностью пораженных сосновых лесов составила 500–600 га [18]. На территории Восточно-Уральского радиоактивного следа, сформировавшегося в результате Кыштымской аварии в 1957 г., к осени 1959 г. сосна полностью погибла на участках площадью 2000 га [17, 19].

Ценообразующим сообществом является древесный ярус, при поражении которого нарушаются структура и функционирование лесной экосистемы в целом [13, 17, 20]. Таким образом, для оценки острого радиационного воздействия на биоту в качестве референтного природного сообщества выбрано хвойное (сосновое) насаждение. Немаловажным обстоятельством в пользу такого выбора является наличие данных для параметризации расчетных моделей, полученных в ходе масштабных исследований в области лесной радиоэкологии после Кыштымской и Чернобыльской аварий.

По рекомендации МКРЗ сосновые деревья входят в состав шести референтных организмов, характеризующих наземные экосистемы [21, 22]. Необходимо подчеркнуть различие понятий “референтная сосна” и “референтное сосновое насаждение”. В первом случае для соснового дерева, представленного в виде эллипсоида с определенными размерами, рассчитаны значения дозовых коэффициентов для внутреннего облучения от радионуклидов, содержащихся в пределах условного эллипсоида [21]. В качестве источника внешнего облучения рассматривается верхний слой почвы, содержащий радионуклиды. Такой подход не отражает специфику первого периода после радиоактивных выпадений, в течение которого основная дозовая нагрузка формируется радионуклидами (прежде всего короткоживущими), осевшими на кроны древесных растений. Выделение референтного соснового насаждения с определенными характеристиками позволяет описать процессы миграции радионуклидов в системе “атмосфера — полог леса — поверхность почвы”. В результате можно рассчитать динамику дозовой нагрузки на древесный ярус в первый послеварийный период и оценить острое радиационное воздействие на сообщество древесных растений [23].

### *Подход к оценке радиоэкологического аварийного риска*

Каждый ядерно-энергетический объект, как источник потенциального воздействия на природную среду, можно охарактеризовать двумя ти-



**Рис 1.** Общая схема консервативной оценки аварийного риска воздействия реакторной установки на природную среду.

**Fig. 1.** General scheme of a conservative emergency risk assessment of the impact of a reactor facility on the environment.

пами показателей – вероятностями постулируемых (проектных и запроектных) аварий и характеристиками последствий радиоактивных выбросов для референтного природного сообщества. В глоссарии МАГАТЭ, содержащем определения основных понятий в области ядерной безопасности и радиационной защиты, аварийный риск определяется следующим образом [24]:

$$R = \sum_i p_i C_i,$$

где  $p_i$  – вероятность реализации  $i$ -го аварийного сценария,  $C_i$  – характеристика последствий реализации  $i$ -го аварийного сценария.

В качестве характеристики последствий аварии ( $C$ ) можно рассматривать различные показатели с возможным учетом неопределенностей их оценки. Как отмечено в [24], неопределенности могут быть представлены как составляющие величины  $C$  или в виде вариабельности итогового показателя  $R$ .

В работе [25] выполнено сопоставление радиоэкологических аварийных показателей для трех реакторов различного типа. При проведении оценок выбраны единичные, тяжелые аварийные сценарии для каждого реактора без учета вероятностей их реализации. Выполнено радиоэкологическое ранжирование сценариев на основе двух методических подходов:

– “точечная” консервативная оценка индекса радиационного воздействия ( $RIF$ ) на природное сообщество – древесный ярус соснового леса [26];

– расчет показателя, учитывающего пространственное распределение выпадений и соответственно вариабельность дозовых нагрузок на древесный ярус.

При различии в количественных оценках качественные результаты радиоэкологического ранжирования аварийных сценариев, полученные двумя методами, совпадают [25]. Таким образом, для скрининговой сравнительной оценки ядерно-энергетических объектов как источников потенциального радиационного воздействия на биоту можно использовать консервативный подход. В этом случае характеристикой последствий реализации аварийного сценария ( $C$ ) будет являться индекс радиационного воздействия, равный отношению максимальной дозовой нагрузки на референтное природное сообщество к дозовому пределу. Общая схема подхода к оценке радиоэкологического аварийного риска для реакторной установки приведена на рис. 1.

#### Дозовый критерий

Для оценки индекса радиационного воздействия необходимо установить дозовый предел для референтного природного объекта. Следует подчеркнуть, что рекомендуемый МКРЗ пороговый уровень мощности дозы хронического облучения

1 мГр/сут [21] не пригоден для оценки последствий острого облучения. Это связано со значительным снижением мощности дозы в течение первого годичного периода после аварийного выброса [23]. Поскольку дозовые нагрузки при тяжелых аварийных сценариях могут вызвать гибель деревьев сосны, в качестве дозового предела целесообразно рассматривать летальную дозу.

Согласно данным, полученным в крупномасштабном эксперименте “Экос” по острому облучению леса [13], значения  $LD_{50}$  и  $LD_{100}$  для сосны составляют 38 и 100 Гр соответственно [20]. Следует подчеркнуть, что в условиях контролируемого эксперимента “Экос” проведено экспериментальное измерение дозовой нагрузки на древесные растения. При анализе экологических последствий радиоактивных выпадений в результате аварии на Чернобыльской АЭС гибель сосновых насаждений зафиксирована при дозе выше 60 Гр. [27]. Как отмечено в монографии [28], деревья в ближней зоне ЧАЭС погибали при дозе от 15 до 100 Гр. Таким образом, на основе данных [13, 20] и не противоречащей им информации [27, 28] значение дозы, приводящей к полной гибели сосны при остром облучении, принято равным 100 Гр.

## РАСЧЕТНЫЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ И ИСХОДНЫЕ ДАННЫЕ

### *Модели и параметры*

Дозовые нагрузки на древесные растения оценивали с использованием совокупности миграционных и дозиметрических моделей [23]. Перенос радионуклидов в атмосфере рассчитывали на основе гауссовой модели. Метеорологические параметры устанавливали по результатам обработки большого массива метеоданных (более 8 тыс. записей) в рамках проекта МАГАТЭ INPRO ENV-PE [29]. Согласно этим данным, наиболее встречающаяся категория атмосферы – F, скорость ветра – 0.5 м/с. При моделировании процессов перераспределения радионуклидов в лесной экосистеме учитывали их первоначальное задержание кронами деревьев, экологическое очищение полога леса и радиоактивный распад [23]. Значение коэффициента задерживания радионуклидов (для плотно сомкнутых насаждений) принято равным 0.9 [30]; величина константы экологического очищения полога леса составила  $7.7 \times 10^{-3} \text{ сут}^{-1}$  [15].

Дозовые нагрузки на кроны древесных растений рассчитывали от двух источников ионизирующего излучения – радионуклиды в пологе леса (толстый бесконечный источник) и на поверхности почвы (тонкий бесконечный источник) [23]. При параметризации моделей толщина слоя “кроны древесных растений” принята равной 10 м, плотность воздушно-растительной смеси –

2.4 кг/м<sup>3</sup> [23]. Кроме дозовых нагрузок от радионуклидов, распределенных в системе “древесные растения – поверхность почвы”, оценены дозы кратковременного облучения древесного яруса от ИРГ в составе радиоактивного облака, согласно методике [31].

В результате применения миграционно-дозиметрических моделей получены значения обобщенных дозовых коэффициентов, позволяющих оценить годовую дозовую нагрузку на древесные растения от каждого радионуклида, поступающего в атмосферу в результате аварии. В рамках консервативной оценки выбраны максимальные величины этих показателей для территории радиоактивного следа. Расчеты показали, что для аварий с малой высотой выброса наибольшая плотность выпадений может быть зафиксирована на промплощадке. При таких сценариях максимальная доза облучения референтного природного сообщества формируется на границе промплощадки.

В табл. 1 приведены значения обобщенных дозовых коэффициентов для основных дозообразующих радионуклидов с единичной активностью в составе аварийных выбросов с высотами 10 и 40 м. Значения, представленные в табл. 1, рассчитаны для фиксированных метеоусловий (категория атмосферы – F, скорость ветра – 0.5 м/с), с учетом характеристик референтного природного сообщества.

### *Характеристики аварийных сценариев*

Для апробации подхода к сравнительной оценке ядерно-энергетических объектов с точки зрения потенциального радиационного воздействия на биоту использованы данные, характеризующие постулированные аварии на реакторных установках различного типа. Рассмотрены аварийные сценарии, разработанные для зарубежных реакторов PWR-890, BWR-1412, EPR-1600 и российских реакторов ВВЭР-1000 и ВВЭР-1200. Основные характеристики сценариев (суммарная выбрасываемая активность, высота выброса и вероятность аварии) представлены в табл. 2. Активности отдельных радионуклидов в составе выбросов приведены в [10–12, 32, 33]. Анализ “входной” для радиоэкологических расчетов информации показывает, что параметры аварийных выбросов рассматриваемых реакторных установок существенным образом различаются. Это касается как активностей выбрасываемых в атмосферу радионуклидов и высот выбросов, так и вероятностей аварийных событий. Содержательный анализ процессов, формирующих столь различные характеристики аварийных выбросов, представляет собой важную задачу “не радиоэкологического” плана.

**РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКОЕ РАНЖИРОВАНИЕ РЕАКТОРНЫХ УСТАНОВОК**

Для всех аварийных сценариев (табл. 2) рассчитаны индексы радиационного воздействия на древесный ярус соснового леса с использованием консервативного подхода. Значения этого показателя варьируют в широком диапазоне для каждой реакторной установки. Так, для реактора PWR-890 величина RIF изменяется от 22 до 57, для BWR-1412 – от 5 до 23, для EPR-1600 – от 0.001 до 8300. Широкий диапазон варьирования обусловлен существенным различием в характеристиках аварийных сценариев, к которым относятся: радионуклидный состав выброса, активности поступающих в атмосферу радионуклидов и высота выброса.

Следует подчеркнуть, что для большинства аварийных сценариев реакторов PWR-890, BWR-1412 и EPR-1600 индекс радиационного воздействия превышает единицу. Это означает, что максимальная дозовая нагрузка на древесные растения превышает установленный дозовый критерий (летальную дозу). Для российских реакторов ВВЭР-1000 и ВВЭР-1200 значения RIF существенно меньше единицы. Минимальное и максимальное значения этого показателя для ВВЭР-1000 равны 0.0005 и 0.77, а для ВВЭР-1200—0.0001 и 0.037 соответственно.

На основе результатов расчетов можно сделать вывод о том, что сравнительная радиоэкологическая оценка реакторных установок по данным единичного аварийного сценария не является полноценной [25]. В силу существенной вариативности характеристик отдельных сценариев для ранжирования реакторов с точки зрения потенциального радиационного воздействия на природную среду необходимо рассматривать совокупности всех постулированных аварий.

На рис. 2 представлены результаты сравнительной аварийной радиоэкологической оценки рассматриваемых реакторов на основе данных, характеризующих активности выбрасываемых радионуклидов и вероятности аварий [10–12, 32, 33]. Наиболее потенциально опасной для биоты, согласно консервативной оценке RIF, является реакторная установка PWR-890. При расчетах для этого реактора из диапазона вероятностей реализации аварийных сценариев (табл. 2) выбраны наибольшие значения. Несмотря на то что в “аварийном перечне” реактора EPR-1600 присутствует наиболее тяжелый по суммарной выбрасываемой активности сценарий, вклад этого сценария в значение итогового показателя (R) компенсируется малой вероятностью его реализации.

Вероятности постулируемых аварий на реакторных установках ВВЭР-1000 и ВВЭР-1200 ( $10^{-6}$ – $10^{-7}$  год<sup>-1</sup>) сопоставимы со значениями аналогичных показателей для реакторов PWR-890,

**Таблица 1.** Обобщенные дозовые коэффициенты, характеризующие максимальную дозовую нагрузку на референтное сосновое насаждение, мкГр/(год Бк)  
**Table 1.** Generalized dose coefficients characterizing the maximum radiation dose to the reference pine plantation,  $\mu\text{Gy}/(\text{year Bq})$

Радионуклид	Высота выброса	
	10 м	40 м
<sup>140</sup> Ba	$1.03 \times 10^{-8}$	$9.41 \times 10^{-10}$
<sup>141</sup> Ce	$1.20 \times 10^{-8}$	$1.09 \times 10^{-9}$
<sup>143</sup> Ce	$1.58 \times 10^{-9}$	$1.44 \times 10^{-10}$
<sup>144</sup> Ce	$1.56 \times 10^{-8}$	$1.42 \times 10^{-9}$
<sup>134</sup> Cs	$1.35 \times 10^{-7}$	$1.23 \times 10^{-8}$
<sup>136</sup> Cs	$1.42 \times 10^{-8}$	$1.30 \times 10^{-9}$
<sup>137</sup> Cs	$8.82 \times 10^{-8}$	$8.02 \times 10^{-9}$
<sup>131</sup> I (аэрозоль)	$4.98 \times 10^{-9}$	$4.54 \times 10^{-10}$
<sup>140</sup> La	$3.90 \times 10^{-9}$	$3.57 \times 10^{-10}$
<sup>99</sup> Mo	$3.17 \times 10^{-9}$	$2.90 \times 10^{-10}$
<sup>95</sup> Nb	$1.26 \times 10^{-9}$	$1.14 \times 10^{-10}$
<sup>147</sup> Nd	$6.64 \times 10^{-9}$	$6.06 \times 10^{-10}$
<sup>239</sup> Np	$7.19 \times 10^{-10}$	$6.58 \times 10^{-11}$
<sup>143</sup> Pr	$9.83 \times 10^{-9}$	$8.97 \times 10^{-10}$
<sup>241</sup> Pu	$1.14 \times 10^{-9}$	$1.04 \times 10^{-10}$
<sup>86</sup> Rb	$2.87 \times 10^{-8}$	$2.62 \times 10^{-9}$
<sup>105</sup> Rh	$6.48 \times 10^{-10}$	$5.90 \times 10^{-11}$
<sup>103</sup> Ru	$1.32 \times 10^{-8}$	$1.20 \times 10^{-9}$
<sup>106</sup> Ru	$2.80 \times 10^{-7}$	$2.55 \times 10^{-8}$
<sup>127</sup> Sb	$4.30 \times 10^{-9}$	$3.92 \times 10^{-10}$
<sup>89</sup> Sr	$5.14 \times 10^{-8}$	$4.68 \times 10^{-9}$
<sup>90</sup> Sr	$4.50 \times 10^{-8}$	$4.09 \times 10^{-9}$
<sup>127m</sup> Te	$1.33 \times 10^{-9}$	$1.21 \times 10^{-10}$
<sup>129m</sup> Te	$1.44 \times 10^{-9}$	$1.31 \times 10^{-10}$
<sup>131m</sup> Te	$1.14 \times 10^{-9}$	$9.43 \times 10^{-11}$
<sup>132</sup> Te	$8.53 \times 10^{-10}$	$7.78 \times 10^{-11}$
<sup>90</sup> Y	$7.91 \times 10^{-9}$	$7.22 \times 10^{-10}$
<sup>91</sup> Y	$5.86 \times 10^{-8}$	$5.33 \times 10^{-9}$
<sup>95</sup> Zr	$3.03 \times 10^{-8}$	$2.76 \times 10^{-9}$
<sup>85</sup> Kr	$4.71 \times 10^{-12}$	$2.49 \times 10^{-13}$
<sup>88</sup> Kr	$4.10 \times 10^{-9}$	$2.22 \times 10^{-10}$
<sup>133</sup> Xe	$5.02 \times 10^{-11}$	$2.66 \times 10^{-12}$

**Таблица 2.** Основные характеристики аварийных сценариев  
**Table 2.** Basic characteristics of emergency scenarios

Реактор	Сценарии	Суммарная активность, ТБк	Высота выброса, м	Вероятность, год <sup>-1</sup>
PWR-890	1	$7.51 \times 10^6$	8.4	$1.0 \times 10^{-5} - 2.0 \times 10^{-5}$
	2	$7.33 \times 10^6$	8.4	$1.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-6}$
	3	$1.38 \times 10^6$	24.6	$4.0 \times 10^{-7}$
	4	$5.79 \times 10^6$	24.6	$4.0 \times 10^{-7}$
BWR-1412	1	$1.76 \times 10^7$	39.6	$3.0 \times 10^{-6}$
	2	$1.74 \times 10^7$	39.6	$3.0 \times 10^{-7}$
	3	$2.38 \times 10^7$	39.6	$3.0 \times 10^{-7}$
EPR-1600	1	$5.70 \times 10^4$	34.7	$1.49 \times 10^{-7}$
	2	$1.90 \times 10^5$	60.7	$4.84 \times 10^{-7}$
	3	$2.12 \times 10^7$	35.7	$8.06 \times 10^{-12}$
	4	$2.23 \times 10^7$	35.7	$5.84 \times 10^{-12}$
	5	$2.18 \times 10^7$	35.7	$1.02 \times 10^{-8}$
	6	$2.37 \times 10^7$	35.7	$6.98 \times 10^{-9}$
	7	$2.06 \times 10^7$	35.7	$2.67 \times 10^{-11}$
	8	$2.11 \times 10^7$	35.7	$8.37 \times 10^{-12}$
	9	$2.07 \times 10^7$	35.7	$1.23 \times 10^{-9}$
	10	$2.16 \times 10^7$	35.7	$1.09 \times 10^{-9}$
	11	$1.58 \times 10^7$	35.7	$6.51 \times 10^{-13}$
	12	$2.02 \times 10^7$	35.7	$3.96 \times 10^{-11}$
	13	$2.02 \times 10^7$	35.7	$1.27 \times 10^{-9}$
	14	$2.02 \times 10^7$	35.7	$3.29 \times 10^{-8}$
	15	$2.65 \times 10^6$	24.7	$4.14 \times 10^{-9}$
	16	$1.11 \times 10^7$	24.7	$5.01 \times 10^{-9}$
	17	$1.04 \times 10^8$	10	$3.83 \times 10^{-9}$
ВВЭР-1200	1	$1.15 \times 10^2$	30	$1.0 \times 10^{-6}$
	2	$1.49 \times 10^4$	30	$1.0 \times 10^{-7}$
ВВЭР-1000	1	$2.42 \times 10^2$	25	$1.0 \times 10^{-6} *$
	2	$4.50 \times 10^5$	25	$1.0 \times 10^{-7} *$

\* Вероятности для ВВЭР-1000 соответствуют вероятностям для ВВЭР-1200.

BWR-1412 и для двух сценариев реактора EPR-1600. Однако вследствие относительно небольших активностей радионуклидов в составах ава-

рийных выбросов российских реакторов значения радиологических рисков для ВВЭР-1000 и ВВЭР-1200 являются невысокими. При этом ве-



**Рис. 2.** Аварийные риски воздействия реакторных установок на природную среду.

**Fig. 2.** Emergency risks of the impact of reactor facilities on the natural environment.

личина *R* для реактора нового поколения ВВЭР-1200 ниже величины *R* для реактора ВВЭР-1000 в 20 раз.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях развития ядерной энергетики, создания новых реакторных установок и топливных циклов необходимы радиоэкологические оценки, позволяющие сопоставить реакторы как источники потенциальной опасности для природной среды. Предложен подход для такого сопоставления на основе рисков радиационного воздействия на референтное природное сообщество – древесный ярус хвойного (соснового) леса. Входной информацией для расчета рисков являются характеристики аварийных сценариев, разработанных для реакторных установок. Предложенный подход может быть использован для радиоэкологической оценки не только энергоблоков АЭС, но и других объектов ядерного топливного цикла, представляющих собой источники потенциальной радиационной опасности. Такую оценку на этапе планирования ядерно-энергетических объектов и систем можно рассматривать в качестве одного из элементов их экологического обоснования [4].

Разработанный подход апробирован на основе данных, характеризующих вероятности постулированных аварий на реакторах различного типа и активности радионуклидов в составе прогнозируемых атмосферных выбросов. Результаты расчета показали, что риски для природной среды существенным образом варьируют в зависимости от особенностей реакторной установки, определяющих параметры аварийных сценариев. Наиболее безопасным для биоты, согласно выполненным

оценкам, является реактор ВВЭР-1200, относящийся к поколению “3+”.

Следует подчеркнуть возможность дальнейшего развития подхода к оценке аварийных радиоэкологических рисков для природной среды с учетом распределения дозовой нагрузки по территории радиоактивного следа. Применение такого “пространственного” подхода продемонстрировано в работе [25] для единичных аварийных сценариев.

Результаты итоговой радиоэкологической оценки в значительной степени определяются входными данными – вероятностями постулированных аварий и параметрами радиоактивных выбросов. Для корректного сопоставления ядерно-энергетических объектов как потенциальных источников радиационного воздействия на природную среду аварийные сценарии целесообразно формировать на основе унифицированных методик.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nuclear Power Reactors in the World. IAEA-RDS-2/39. IAEA, Vienna, 2019. 86 p.
2. Алексеев П.Н., Гагаринский А.Ю., Калугин М.А. и др. К стратегии развития ядерной энергетики России // Атомная энергия. 2019. Т. 126. Вып. 4. С. 183–187. [Alexeev P.N., Gagarinskii A.Y., Kalugin M.A., et al. On a Strategy for the Development of Nuclear Power in Russia // Atomic Energy. 2019. V. 126. № 4. P. 207–212. (In Russian)]
3. Алексахин Р.М. Актуальные экологические проблемы ядерной энергетики // Атомная энергия. 2013. Т. 114. Вып. 5. С. 243–249. [Alexakhin R.M. Topical environmental problems of nuclear power // Atomic Energy. 2013. V. 114. № 5. P. 301–307. (In Russian)]
4. Спиридонов С.И. Перспективы системной радиоэкологии в решении инновационных задач ядерной энергетики // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 4. С. 415–422. [Spiridonov S.I. Prospects of systemic radioecology in solving innovative tasks of nuclear power engineering // Radiats. Biol. Radioecol. 2014 Jul-Aug. V. 54. №4. P. 415–22. (In Russian)]
5. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009): Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 100 с. [Normy radiatsionnoj bezopasnosti (NRB-99/2009): Sanitarnye pravila i normativy SanPiN 2.6.1.2523-09. M.: Federal'nyj tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2009. 100 s. Radiation Safety Standards (RSS-99/2009): Sanitary epidemiological rules and standards SanPin 2.6.1.2523-09. Moscow, Federal Centre of Hygiene and Epidemiology Rospotrebnadzora, 2009, 100 p. (In Russian)]
6. Санитарные правила проектирования и эксплуатации атомных станций (СП АС-03). Санитарные правила и гигиенические нормативы. СанПин 2.6.1.24-03. М.: Минздрав России, 2003. 41 с. [Sanitarnye pravila i gigienicheskie normativy. SanPin 2.6.1.24-03. M.: Minzdrav Rossii, 2003. 41 s.]

- tarnye pravila proektirovaniya i ekspluatatsii atomnykh stantsij (SP AS-03). Sanitarnye pravila i gigenicheskie normativy. SanPin 2.6.1.24-03. M.: Minzdrav Rossii, 2003. 41 s. Sanitary rules of design and operation of nuclear power plants (SP AS-03). Sanitary rules and hygiene standards SP 2.6.1.24-03. Moscow: Russian Ministry of Health, 2003. 41 p. (In Russian)]
7. Radiation Protection and Safety of Radiation Sources: International Basic Safety Standards. IAEA Safety Standards Series No. GSR Part 3. Vienna: IAEA, 2014. 436 p.
  8. Nuclear Accident Knowledge Taxonomy. IAEA Nuclear Energy Series, № NG-T-6.8. Vienna: IAEA, 2016. 52 p.
  9. Approaches to Safety Evaluation of New and Existing Research Reactor Facilities in Relation to External Events. IAEA Safety Report Series. № 94. Vienna: IAEA, 2016. 132 p.
  10. State-of-the-Art Reactor Consequence Analyses Project. V. 2: Surry Integrated Analysis (NUREG/CR-7110. V. 2. Revision 1). Office of Nuclear Regulatory Research, 2013. 559 p.
  11. State-of-the-Art Reactor Consequence Analyses Project. Volume 1: Peach Bottom Integrated Analysis (NUREG/CR-7110. V. 1. Revision 1). Office of Nuclear Regulatory Research, 2013. 329 p.
  12. Hinkley Point C Pre-Construction Safety Report. NNB Generation Company Limited, United Kingdom. 2012. Chapter 15. Sub-chapter 15-4. UK EPR-0002-154 Issue 06. 252 p.
  13. *Alexakhin R.M., Karaban R.T., Prister B.S. et al.* The effects of acute irradiation on a forest biogeocenosis (experimental data, model and practical applications to accidental cases) // *Sci. Total Environ.* 1994. V. 157. № 4. P. 357–369.
  14. *Спирidonov С.И., Фесенко С.В., Алексахин Р.М., Спирин Д.А.* Математическое моделирование последствий острого лучевого воздействия на древесный ярус лесного биogeоценоза // *Радиобиология.* 1989. Т. 29. Вып. 4. С. 544–549. [*Spiridonov S.I., Fesenko S.V., Alexakhin R.M., Spirin D.A.* Matematicheskoe modelirovanie posledstviy ostrogo luchevo go vozdeystviya na drevesnuy yarus lesnogo biogeotsenoza (Mathematical modelling of the consequences of the acute radiation exposure of the wood layer of the forest biogeocenosis) // *Radiobiologiya.* 1989. T. 29. Vyp. 4. S. 544–549. (In Russian)]
  15. *Тихомиров Ф.А.* Действие ионизирующих излучений на экологические системы. М.: Атомиздат, 1972. 174 с. [*Tikhomirov F.A.* Dejstvie ioniziruyushchikh izluchenij na ekologicheskie sistemy (Action of ionizing radiation on ecological systems). M.: Atomizdat, 1972. 174 s. (In Russian)]
  16. *Алексахин Р.М.* Ядерная энергия и биосфера. М.: Энергоиздат, 1982, 215 с. [*Alexakhin R.M.* Yadernaya energiya i biosfera (Nuclear energy and biosphere). M.: Energoizdat, 1982, 215 с. (In Russian)]
  17. Крупные радиационные аварии: Последствия и защитные меры / Под общ. ред. Л.А. Ильина и В.А. Губанова. М.: ИздАТ, 2001. 752 с. [Kрупnye radiatsionnye avarii: Posledstviya i zashchitnye меры (Major radiation accidents: consequences and protective measures) / Pod obshch. red. L.A. Il'ina i V.A. Gubanova. M.: IzdAT, 2001. 752 s. (In Russian)]
  18. *Козубов Г.М., Таскаев А.И.* Радиобиологические и радиоэкологические исследования древесных растений. Санкт-Петербург: Наука, 1994. 255 с. [*Kozubov G.M., Taskaev A.I.* Radiobiologicheskie i radioekologicheskie issledovaniya drevesnykh rastenij (Radiobiological and radioecological investigations of tree plants). Sankt-Peterburg: Nauka, 1994. 255 с. (In Russian)]
  19. *Лазуков М.И., Чупрунов В.С.* Радиологические исследования в лесах на территории ВУРСа // Вопросы лесной радиоэкологии / Под ред. А.И. Чилимова. М., 2000. С. 101–119. [*Lazukov M.I., Chuprunov V.S.* Radiologicheskie issledovaniya v lesakh na territorii VURSa (Radiological studies in the forests of EURT) // *Voprosy lesnoj radioekologii / Pod red. A.I. Chilimova.* Moskva, 2000. С. 101–119. (In Russian)]
  20. *Спирин Д.А., Романов Г.Н., Федоров Е.А., Алексахин Р.М.* Радиэкологический сдвиг в фитоценозах и возможный критерий его прогнозирования // *Экология.* 1988. № 4. С. 25–29. [*Spirin D.A., Romanov G.N., Fedorov E.A., Alexakhin R.M.* Radioecological shift in phytocenoses and a possible criterion for its prediction // *Ekologiya.* 1988. № 4. P. 25–29. (In Russian)]
  21. Environmental Protection: the Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108 // *Ann. ICRP.* 2008. V. 38. № 4–6. 242 p.
  22. Dose Coefficients for Non-human Biota Environmentally Exposed to Radiation. ICRP Publication 136 // *Ann. ICRP.* 2017. V. 46. № 2. 136 p.
  23. *Микаилова Р.А., Спирidonov С.И.* Доза облучения древесного яруса хвойного леса, обусловленная аварийным выбросом АЭС // *Атомная энергия.* 2017. Т. 123. Вып. 63. С. 165–170. [*Mikailova R.A., Spiridonov S.I.* Irradiation dose of the woody tier of a coniferous forest due to accidental emissions from NPP // *Atomic Energy.* 2018. V. 123. № 3. P. 202–208. (In Russian)]
  24. IAEA Safety Glossary. Terminology Used in Nuclear Safety and Radiation Protection. Vienna: IAEA, 2019. 278 p.
  25. *Спирidonov С.И., Микаилова Р.А.* Сравнительная радиэкологическая оценка сценариев тяжелых аварий на АЭС на основе риска для природного сообщества // *Атомная энергия.* 2018. Т. 125. Вып. 3. С. 175–180. [*Spiridonov S.I., Mikailova R.A.* Comparative radioecological assessment of serious-accident scenarios in NPP on the basis of the risk for natural communities // *Atomic Energy.* 2019. T. 125. № 3. С. 198–203. (In Russian)]
  26. *Fesenko S.V., Alexakhin R.M., Geraskin S.A. et al.* Comparative radiation impact on biota and man in the area affected by the accident at the Chernobyl nuclear power plant // *J. Environ. Radioactivity.* 2005. V. 80. P. 1–25.
  27. *Arkhipov N.P., Kuchma N.D., Askbrant S. et al.* Acute and long-term effects of irradiation on pine (*Pinus silvestris*) stands post-Chernobyl // *Sci. Total Environ.* 1994. V. 157. № 4. P. 383–386.
  28. *Абатуров Ю.Д., Абатуров А.В., Быков А.В. и др.* Влияние ионизирующего излучения на сосновые леса в ближней зоне Чернобыльской АЭС. М.: На-

- ука, 1996. 240 с. [*Abaturov Yu.D., Abaturov A.V., Bykov A.V. i dr. Vliyanie ioniziruyushchego izlucheniya na sosnovye lesa v blizhnej zone Chernobyl'skoj AES (Influence of ionizing radiation on pine forests in the near zone of Chernobyl NPP)*]. М.: Nauka, 1996. 240 с. (In Russian)]
29. *Dvorzhak A., Mora J.C., Robles B.* Probabilistic risk assessment from potential exposures to the public applied for innovative nuclear installations // *Reliabil. Engineer. & Syst. Safety*. 2016. V. 152. P. 176–186.
30. *Алексахин Р.М., Нарышкин М.А.* Миграция радионуклидов в лесных биогеоценозах. М.: Наука, 1977. 144 с. [*Alexakhin R.M., Naryshkin M.A. Migratsiya radionuklidov v lesnykh biogeotsenozakh (Migration of radionuclides in forest biogeocenoses)*]. М.: Nauka. 1977. 144 с. (In Russian)]
31. *Vives i Batlle J., Jones S.R., Coplestone D.* A method for estimating  $^{41}\text{Ar}$ ,  $^{85,88}\text{Kr}$  and  $^{131\text{m},133}\text{Xe}$  doses to non-human biota // *J. Environ. Radioact.* 2015. V. 144. P. 152–161.
32. Обоснование инвестирования в строительство атомной электростанции в республике Беларусь. Этап 4. Оценка воздействия на окружающую среду. Кн. 4. Раздел 9. Характеристика окружающей среды и оценка воздействий на нее БелАЭС. Почвы. Сельское хозяйство. Оценка радиационного воздействия на агроэкосистемы. 1588-ПЗ-ОИ4 Белнипиэнергопром, 2009. 209 с. [Обоснование инвестирования в строительство атомной электростанции в республике Беларусь. Этап 4. Оценка воздействия на окружающую среду. Кн. 4. Раздел 9. Характеристика окружающей среды и оценка воздействий на нее БелАЭС. Почвы. Сельское хозяйство. Оценка радиационного воздействия на агроэкосистемы. 1588-ПЗ-ОИ4 Белнипиэнергопром, 2009. 209 с. (In Russian)]
33. Обоснование инвестирования в строительство атомной электростанции в республике Беларусь. Кн. 11. Оценка воздействия на окружающую среду. Ч. 8. Отчет об ОВОС. Ч. 8.3. Оценка воздействия АЭС на окружающую среду. 1588-ПЗ-ОИ4 (Редакция 06.07.2010 г.). Белнипиэнергопром, 2010. 167 с. [Обоснование инвестирования в строительство атомной электростанции в республике Беларусь. Кн. 11. Оценка воздействия на окружающую среду. Ч. 8. Отчет об ОВОС. Ч. 8.3. Оценка воздействия АЭС на окружающую среду. 1588-ПЗ-ОИ4 (Redaktsiya 06.07.2010 g.). Belniপিenergoprom, 2010. 167 s. (In Russian)]

## Ranking of Reactor Facilities Based on the Assessment of Potential Radiation Impact on the Environment

S. I. Spiridonov<sup>a,#</sup> and R. A. Mikailova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia*

<sup>#</sup> *E-mail: spiridonov.si@gmail.com*

The paper presents a methodological approach to the comparative assessment of reactor units and other nuclear power facilities in terms of the potential impact of accidental releases on the environment. The approach is based on the calculation of the radioecological risk taking into account the probabilities of the occurrence of postulated accidents and the parameters of radioactive releases for the set of emergency scenarios. The tree layer of the pine forest is considered as a reference natural community. The radiation exposure index is used to characterize the effects of radioactive fallout. The risk values were calculated for a number of Russian (VVER-1000, VVER-1200) and foreign (PWR-890, BWR-1412, EPR-1600) reactor units and their radioecological ranking was performed. It was established that the new generation VVER-1200 reactor is the safest for biota.

**Keywords:** reactor installations, natural environment, emergency scenarios, radioecological assessment, radiation doses, wood layer of the forest

УДК 574.4:539.163:633.2.032:614.876

## МОДЕЛЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТИЦ ХРОНИЧЕСКИХ РАДИОАКТИВНЫХ ВЫПАДЕНИЙ В ЛУГОВОМ БИОГЕОЦЕНОЗЕ

© 2020 г. А. Н. Переволоцкий<sup>1,\*</sup>, Т. В. Переволоцкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия*

*\*E-mail: forest\_rad@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.06.2019 г.

После доработки 03.09.2019 г.

Принята к публикации 18.09.2019 г.

В статье обосновано применение компартментной модели распределения частиц хронических радиоактивных выпадений в луговом биогеоценозе в течение вегетационного периода. Показано, что динамика распределения частиц между тремя компартментами (надземной фитомассы растений, растительным опадом и поверхностным слоем дернины) лугового биогеоценоза может быть описана системой линейных однородных дифференциальных уравнений I порядка. Приведено решение системы дифференциальных уравнений методом операционного исчисления и путем замены дифференциалов на конечно-разностные аналоги, отражены особенности их применения. На основании литературных данных установлен диапазон значений параметров переноса частиц выпадений между исследуемыми компартментами. Выполнены тестовые примеры расчетов динамики активности <sup>131</sup>I в компартментах лугового биогеоценоза при хронических радиоактивных выпадениях для наиболее типичных параметров переноса. Расчеты реализованы для условий, соответствующих постоянной и изменяющейся в течение вегетационного сезона величинам коэффициента первоначального задерживания частиц выпадений надземной фитомассой растений. Показано, что наибольшая активность радионуклида в составе частиц выпадений в течение вегетационного периода прогнозируется для растительного опада. Активность <sup>131</sup>I в надземной фитомассе растений возрастает пропорционально изменениям величины коэффициента первоначального задерживания, а при постоянной его величине – выходит на плато на 15–20 в сутки с момента начала выпадений.

**Ключевые слова:** хронические радиоактивные выпадения, радионуклиды, постоянная распада, постоянная очищения, плотность выпадений, луговые биогеоценозы

**DOI:** 10.31857/S0869803120040086

Одной из важнейших задач при проведении оценок воздействия на окружающую среду радиоактивных выбросов предприятий ядерного топливного цикла на этапе обоснования инвестирования их строительства или модернизации является прогнозирование содержания радионуклидов в компонентах биогеоценозов [1–3]. Проведение прогнозных расчетов распределения радионуклидов между компонентами биогеоценозов методами математического моделирования позволяет ответить на вопросы о потоках радиоактивных веществ в биогеоценозе, динамике активности радионуклидов в звеньях пищевых цепочек, а также возможных уровнях облучения биоты и человека [4–7]. Применение численных экспериментов [6, 8] позволяет получить необходимую информацию, не прибегая к дорогостоящим натурным экспериментам с внесением радионуклидов, способным вызвать не только дополнительное облучение исследователей, но и радиоактивное загрязнение соответствующих компонент биогео-

ценоза с необходимостью временного или постоянного ограничения их дальнейшего хозяйственного пользования. При хроническом поступлении радионуклидов в биогеоценоз, которое крайне сложно имитировать в природных условиях, это имеет исключительно важное значение. Таким образом, вопрос о математическом моделировании распределения радионуклидов хронических радиоактивных выпадений между компонентами биогеоценоза представляется весьма актуальным; ключевым моментом решения подобных задач должна стать оценка качества получаемых с помощью моделей результатов. При этом одним из важнейших показателей, позволяющих дать оценку надежности модели, является соответствие расчетных результатов данным экспериментальных исследований. В этом аспекте следует отметить, что прогнозирование распределения радионуклидов хронических радиоактивных выпадений в биогеоценозах сопряжено с рядом трудностей, к которым относятся низкая интен-



**Рис. 1.** Блок-схема миграции частиц радиоактивных хронических выпадений в луговом биогеоценозе.  
**Fig. 1.** The block diagram of the migration of particles of radioactive chronic fallout in meadow biogeocenosis.

сивность осаждения радионуклидов на земную поверхность, а также сложность природных биогеоценозов как объектов радиоэкологических исследований. Первую составляющую проблемы можно решить, проводя исследования в зоне хронических радиоактивных выпадений предприятий ядерной энергетики и промышленности с применением современных методик и спектрометрического оборудования, позволяющим достоверно определить низкие активности радионуклидов в компонентах биогеоценозов, а вторую — тщательным подбором объектов исследований, характеризующихся максимальной степенью однородности показателей почвенно-растительного покрова. Однако решение данных проблем является задачей отдельных исследований.

В аспекте хронического радиоактивного загрязнения луговые биогеоценозы являются одними из критичных видов природно-растительных сообществ, обуславливающих поступление радионуклидов в организм человека по “молочной” и “мясной” пищевым цепочкам [4, 6, 9, 10]. По этим причинам радиоэкологические исследования в луговых биогеоценозах были направлены на получение данных по миграции радионуклидов в почве и их корневому накоплению в системе “почва–растение” (наиболее полные обзоры по этим проблемам приведены в [9–11]). Следует отметить, что основная часть исследований посвящена проблемам изучения распределения радио-

нуклидов на отдаленном этапе после аварийных выпадений или моделирующих аварийное радиоактивное загрязнение.

В значительно меньшей степени изучены вопросы аэрального радиоактивного загрязнения компонент лугового биогеоценоза, а тем более — по распределению частиц выпадений при хронических выпадениях радионуклидов. Информация такого рода крайне необходима для оценки формирования радиационно-экологической обстановки в исследуемом классе природно-растительных сообществ.

В связи с этим представляет научный интерес разработка модели распределения частиц хронических радиоактивных выпадений в луговом биогеоценозе, что и стало целью настоящего исследования.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектом исследований является растительная и почвенная компоненты лугового биогеоценоза.

Предмет исследований — закономерности распределения радиоактивных частиц хронических радиоактивных выпадений в луговом биогеоценозе в течение вегетационного периода.

Для проведения модельных расчетов распределения частиц выпадений в луговом биогеоценозе приняты следующие допущения [4, 6, 8–10]:

- объект исследования представлен в виде блок-схемы, содержащей три компартмента, в которых происходит накопление частиц радиоактивных выпадений (рис. 1): надземная фитомасса травянистых растений, растительный опад и поверхностный слой дернины. В составе растительного опада, находящегося непосредственно на поверхности дернины, учитывается ветошь — отмирающие, но не потерявшие связи с материнским растением листья и стебли, а также подстилка (войлок) — лежащие на земле, оторвавшиеся от материнских растений и затронутые разложением растительные остатки [12];

- поступление радионуклидов в виде частиц хронических радиоактивных выпадений на земную поверхность происходит с постоянной интенсивностью  $\sigma$  в размерности Бк м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>. При этом на поверхность надземной фитомассы растений частицы поступают прямо пропорционально коэффициенту первоначального задерживания  $K_3$ . Интенсивность суточного поступления частиц радиоактивных выпадений на поверхность надземной фитомассы  $a$  может быть представлена выражением  $a = \sigma \times K_3$ . Интенсивность суточного поступления частиц в растительный опад  $b$  определяется как  $b = (1 - K_3) \times \sigma$ ;

– предполагается равномерное распределение радионуклидов из состава радиоактивных выпадений по высоте растений и по толщине растительного опада;

– удаление частиц радиоактивных выпадений с поверхности наземной фитомассы травянистых растений на поверхность растительного опада связано с действием метеорологических (стряхивания ветром, смыв атмосферными осадками) и физических (сил гравитации) факторов с постоянной очистки  $\lambda_1$ , сут<sup>-1</sup>. Как правило, в зависимости от дисперсности частиц радиоактивных выпадений,  $\lambda_1$  составляет от 0.017 до 0.34 сут<sup>-1</sup> [4–6];

– перенос радиоактивных частиц из растительного опада на поверхность дернины происходит за счет вымывания атмосферными осадками, гравитационного удаления, биогенной миграции и других факторов с постоянной очистки  $\lambda_2$ , в диапазоне от 0.0069 до 0.034 сут<sup>-1</sup> в зависимости от дисперсности частиц выпадений и физико-химических свойств радионуклидов [4, 9, 10];

– в течение моделируемого периода происходит накопление радионуклидов в поверхностном слое дернины, залегающей непосредственно под растительным опадом [9, 10];

– в каждом из компартментов происходит радиоактивный распад радионуклида с постоянной радиоактивного распада  $\lambda_p$ , сут<sup>-1</sup>.

В соответствии с принятыми допущениями динамика распределения активности радионуклида из состава хронических радиоактивных выпадений может быть описана системой линейных дифференциальных уравнений I порядка:

$$\begin{cases} \frac{dA_1}{dt} = a - A_1\lambda_{\text{э}1} \\ \frac{dA_2}{dt} = b + A_1\lambda_1 - A_2\lambda_{\text{э}2}, \\ \frac{dA_3}{dt} = A_2\lambda_2 - A_3\lambda_p \end{cases} \quad (1)$$

где,  $A_1, A_2, A_3$  – активность радионуклида в наземной фитомассе растений, в растительном опаде и поверхностном слое дернины на 1 м<sup>2</sup> земной поверхности, Бк/м<sup>2</sup>;

$a, b$  – интенсивность суточного поступления радионуклида на поверхность наземной фитомассы и в растительный опад соответственно; Бк м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>;

$\lambda_1$  – постоянная очистки наземной фитомассы от радионуклида, сут<sup>-1</sup>;

$\lambda_2$  – постоянная очистки растительного опада от радионуклида, сут<sup>-1</sup>;

$\lambda_{\text{э}i}$  – эффективная постоянная очистки  $i$ -ком-  
партмента от радионуклида, сут<sup>-1</sup>, равна сумме постоянных очистки  $\lambda_i$  и постоянной радиоактивного распада  $\lambda_p$ .

На начальный момент времени (начало радиоактивных выпадений  $t = 0$ ) во всех компартментах системы содержание радиоактивных частиц равно нулю.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Решение системы (1) найдено двумя методами: с применением операционного исчисления и путем замены дифференциалов на конечно-разностные аналоги.

I. Решение системы линейных дифференциальных уравнений (1) с применением операционного исчисления найдено в виде следующих уравнений динамики активности радионуклида:

– в наземной фитомассе растений, произрастающих на 1 м<sup>2</sup> земной поверхности, Бк/м<sup>2</sup>:

$$A_1(t) = \sigma K_3 \frac{1 - e^{-\lambda_{\text{э}1}t}}{\lambda_{\text{э}1}}; \quad (2)$$

– в растительном опаде, находящемся на 1 м<sup>2</sup> земной поверхности, Бк м<sup>-2</sup>:

$$A_2(t) = \frac{\sigma(\lambda_{\text{э}1} - K_3\lambda_p)}{\lambda_{\text{э}1}\lambda_{\text{э}2}} - \frac{\sigma K_3\lambda_1}{\lambda_{\text{э}1}(\lambda_2 - \lambda_1)} e^{-\lambda_{\text{э}1}t} + \frac{\sigma(\lambda_1 - \lambda_2 + K_3\lambda_2)}{\lambda_{\text{э}2}(\lambda_2 - \lambda_1)} e^{-\lambda_{\text{э}2}t}; \quad (3)$$

– на поверхности дернины, находящейся на 1 м<sup>2</sup> земной поверхности, Бк/м<sup>2</sup>:

$$A_3(t) = A + \frac{1}{E} (be^{-\lambda_{\text{э}1}t} + Ce^{-\lambda_{\text{э}2}t} + De^{-\lambda_p t}), \quad (4)$$

где  $A, B, C, D$  – количественные параметры.

При этом:

$$A = \frac{\sigma\lambda_2(\lambda_{\text{э}1} - K_3\lambda_p)}{\lambda_p\lambda_{\text{э}1}\lambda_{\text{э}2}}, \quad (5)$$

$$B = -\frac{\sigma K_3\lambda_1\lambda_2^2}{\lambda_{\text{э}1}}, \quad (6)$$

$$C = \frac{\sigma\lambda_1\lambda_2(\lambda_1 - \lambda_2 + K_3\lambda_2)}{\lambda_{\text{э}2}}, \quad (7)$$

$$D = -\frac{\sigma\lambda_1\lambda_2(\lambda_1 - \lambda_2)}{\lambda_p}, \quad (8)$$

$$E = \lambda_{\text{э}1}\lambda_{\text{э}2}(\lambda_1 - \lambda_2) - \lambda_{\text{э}1}\lambda_1\lambda_p + \lambda_{\text{э}2}\lambda_2\lambda_p. \quad (9)$$

II. Решение системы линейных дифференциальных уравнений (1) путем замены дифференциалов на конечно-разностные аналоги:

$$\begin{cases} A_{1,t+1} = a + A_{1,t}(1 - \lambda_{31}) \\ A_{2,t+1} = b + A_{1,t}\lambda_1 + A_{2,t}(1 - \lambda_{32}) \\ A_{3,t+1} = A_{2,t}\lambda_2 + A_{3,t}(1 - \lambda_p) \end{cases} \quad (10)$$

Особенность практического применения системы конечно-разностных уравнений состоит в выполнении расчетов на основании рекуррентных соотношений. Для момента времени  $t = 0$  задаются начальные значения активности в правой части уравнений и на их основе рассчитывают величины активности в исследуемых компартментах для момента времени  $t + 1$  в левой части уравнений. Затем полученные значения переносятся в правую часть и становятся исходными для расчетов в последующий момент времени.

Применение обоих методов решения системы линейных дифференциальных уравнений I порядка для последующего прогнозирования активности радионуклидов в луговом биогеоценозе имеет свои преимущества и недостатки.

Расчетные формулы I метода (2)–(9) позволяют спрогнозировать активность радионуклида в исследуемых компартментах, находящихся на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности, в произвольный промежуток времени на протяжении вегетационного сезона хронических радиоактивных выпадений при условии постоянных значений параметров, входящих в систему уравнений.

Применение II метода значительно упрощает проведение расчетов, однако требует их последовательного выполнения на протяжении всего времени прогнозирования (например, чтобы рассчитать активность радионуклида в компартментах на 60-е сутки с момента начала вегетационного сезона, необходимо последовательно провести расчет для каждого из предыдущих 59 сут). Еще одно ограничение применения данного метода определено величинами эффективных постоянных очищения  $\lambda_{3i}$ . Так, для радионуклидов с периодом полураспада  $< 16$  ч постоянная переноса будет  $> 1$ , и в данных условиях модель будет работать некорректно. Положительным моментом в применении данного метода расчета является возможность его проведения при динамически изменяющихся и заданных таблично параметрах модели (в частности,  $\sigma$  и  $K_3$ ). Отметим, что учет динамичного характера изменений коэффициента задерживания в соответствии с логистической кривой более адекватно описывает динамику задерживающей способности надземной фитомассы луговых растений в течение вегетационного периода по отношению к аэральным радиоактивным выпадениям [6, 8, 10].

Применение обоих методов проиллюстрировано на модельном примере, характеризующем распределение частиц хронических радиоактивных выпадений, содержащих  $^{131}\text{I}$ , в луговом биогеоценозе. Приняты следующие допущения: постоянная радиоактивного распада  $\lambda_p = 0.0864 \text{ сут}^{-1}$ , постоянные очищения надземной фитомассы  $\lambda_1 = 0.0495 \text{ сут}^{-1}$  и растительного опада  $\lambda_2 = 0.023 \text{ сут}^{-1}$ , интенсивность поступления на земную поверхность  $\sigma = 1 \text{ Бк м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$  на протяжении всего вегетационного периода [6, 9]. Расчеты выполнены в двух вариантах в течение 72 сут с момента начала периода вегетации: а) с постоянным коэффициентом задерживания частиц выпадений надземной фитомассой  $K_3 = 0.25$  и б) с изменяющейся в течение всего срока прогнозирования величиной  $K_3$  [6, 9]:

$$K_3(t) = 1 - \exp\left(-\mu \frac{m_{\max}}{1 + \exp(c - dt)}\right), \quad (11)$$

где  $\mu$  – эмпирическая константа, отражающая задерживание радиоактивных выпадений растительным покровом и принимается  $0.7 \text{ м}^2/\text{кг}$  на сырую массу [4, 9];  $m_{\max}$  – максимально возможная величина урожайности надземной фитомассы растений,  $\text{кг}/\text{м}^2$ ;  $c$  и  $d$  – параметры логистической зависимости.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчетов динамики активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза, находящихся на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности, при хронических радиоактивных выпадениях, полученные на основе решения системы линейных дифференциальных уравнений (1) методом операционного исчисления (2–9) и конечно-разностных аналогов (10), приведены в табл. 1. На рис. 2 приведена динамика активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза при постоянной величине коэффициента задерживания, а на рис. 3 – при изменяющейся во времени величине  $K_3$ . Расчеты динамики активности (рис. 2 и 3) выполнены с применением конечно-разностных аналогов системы линейных дифференциальных уравнений (10).

Представленные в табл. 1 данные позволяют констатировать отсутствие существенных различий в величинах активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза. В начальный период вегетационного сезона (особенно в первые 2 нед) несколько большие величины активности отмечаются в надземной фитомассе травянистых растений и растительном опаде при применении системы уравнений (10). Для поверхностного слоя дернины, наоборот, наблюдается незначительное превышение активности в первые сутки

**Таблица 1.** Активность  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза, находящихся на  $1\text{ м}^2$  земной поверхности, при хронических радиоактивных выпадениях ( $K_3 = \text{const}$ )

**Table 1.** Activity  $^{131}\text{I}$  in meadow biogeocenosis compartments located on  $1\text{ м}^2$  of the earth's surface during chronic radioactive fallout ( $K_z = \text{const}$ )

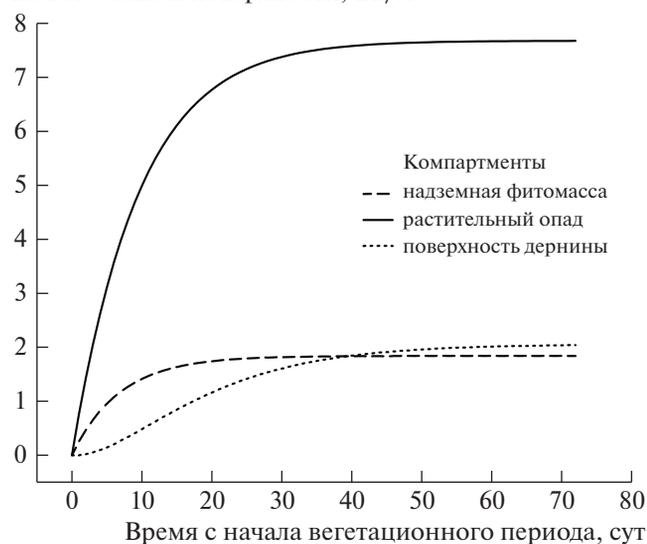
Время с момента начала выпадений, сут	Активность в компартментах лугового биогеоценоза, Бк/м <sup>2</sup>					
	надземная фитомасса растений		растительный опад		поверхностный слой дернины	
	(2–9)	(10)	(2–9)	(10)	(2–9)	(10)
5	0.907	0.953	2.99	3.12	0.161	0.144
10	1.37	1.41	4.84	4.99	0.485	0.482
15	1.59	1.63	5.98	6.11	0.831	0.844
20	1.72	1.74	6.66	6.77	1.34	1.16
25	1.77	1.79	7.07	7.15	1.39	1.42
30	1.81	1.82	7.32	7.38	1.58	1.61
40	1.83	1.83	7.55	7.58	1.82	1.84

при применении формул (2)–(10). Однако эти различия не превышают нескольких процентов и с течением времени снижаются, а по истечении >40 сут практически сглаживаются.

Таким образом, можно отметить одинаковую динамику активности радионуклидов в соответствующих компартментах лугового биогеоценоза при применении обоих методов решения системы линейных дифференциальных уравнений. Следует подчеркнуть, что важным условием применения метода I при описании процессов перераспределения радионуклидов в луговом биогеоценозе является постоянство всех констант пере-

носа и постоянных величин ( $a, b, K_3$ ). Вследствие этого будет наблюдаться практически неизменная величина коэффициента задерживания при стабилизации ростовых процессов растений: высота и биомасса растений станут близки к постоянным величинам, а между приростом и отмиранием биомассы устанавливается динамическое равновесие. Как правило, такая ситуация наиболее вероятна в середине–конце периода вегетации. В первые недели вегетационного периода надземная фитомасса и высота растений, а также

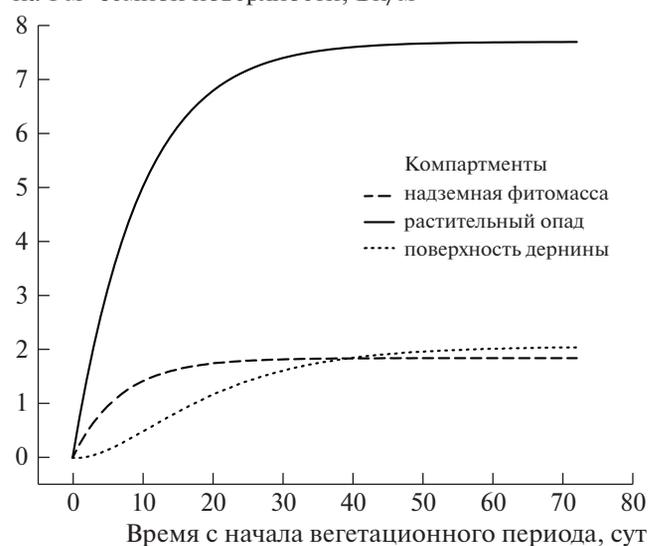
Активность в компартментах, находящихся на  $1\text{ м}^2$  земной поверхности, Бк/м<sup>2</sup>



**Рис. 2.** Динамика активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза при  $K_z = 0.25$ .

**Fig. 2.** The dynamics of  $^{131}\text{I}$  activity in compartments of meadow biogeocenosis at  $K_z = 0.25$ .

Активность в компартментах, находящихся на  $1\text{ м}^2$  земной поверхности, Бк/м<sup>2</sup>



**Рис. 3.** Динамика активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза при изменении  $K_z$  в соответствии с (11).

**Fig. 3.** The dynamics of  $^{131}\text{I}$  activity in compartments of meadow biogeocenosis with a change in  $K_z$  in accordance with (11).

соответствующий им коэффициент задерживания радиоактивных выпадений очень малы. В последующем происходит постепенное увеличение высоты и биомассы растений с соответствующим возрастанием коэффициента задерживания. Соответственно представление о динамике коэффициента задерживания в течение вегетационного сезона будет более точно соответствовать процессам, происходящим в исследуемой экосистеме.

На рис. 2 приведена динамика активности  $^{131}\text{I}$  в компартментах лугового биогеоценоза при неизменной величине  $K_3$ , а на рис. 3 — для  $K_3$ , учитывающего изменения высоты и биомассы травянистых растений в течение исследуемого промежуточного времени.

При постоянном значении  $K_3 = 0.25$  активность  $^{131}\text{I}$  в наземной фитомассе растений, находящихся на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности, наиболее интенсивно увеличивается в течение первых 10 сут с начала выпадений и спустя  $\sim 20$  сут стабилизируется на уровне  $2 \text{ Бк/м}^2$ . При вышеприведенном значении  $K_3$  основное количество выпавших радиоактивных частиц накапливается в растительном опаде, достигая величины  $7.5 \text{ Бк/м}^2$  уже спустя месяц после начала выпадений. Поверхностный слой дернины наименее интенсивно накапливает радиоактивные вещества, что связано с существованием двух компартментов, эффективно перехватывающих частицы выпадений: наземной фитомассы и растительного опада. Активность в поверхностном слое дернины на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности при поступлении в окружающую среду  $^{131}\text{I}$  стабилизируется только спустя 50 сут на уровне  $2 \text{ Бк/м}^2$ . Вполне очевидно, что для каждого из исследуемых компартментов время установления равновесия и величина равновесной активности находятся в прямой зависимости от значений постоянных очищения ( $\lambda_i$ ) и радиоактивного распада ( $\lambda_p$ ).

В случае изменяющихся значений  $K_3$  следует подчеркнуть достаточно сложный характер динамики исследуемых величин в непосредственно экспонированных к выпадениям компартментах. Так, активность в наземной фитомассе в целом повторяет форму динамики  $K_3$  в течение вегетационного периода. Первые две недели характеризуются очень медленным повышением активности (до десятых долей  $\text{Бк/м}^2$ ), связанным со слабой задерживающей способностью травянистых растений лугового биогеоценоза на ранних этапах развития ( $K_3 < 0.05$ ). Наиболее эффективное увеличение активности прогнозируется с 20-х по 50-е сутки вегетационного периода, что объясняется интенсивным нарастанием биомассы растений и почти 10-кратным увеличением коэффициента задерживания. В дальнейшем стабилизация ростовых процессов приводит к постоянной

величине коэффициента задерживания и выходу на плато активности радионуклидов в наземной фитомассе на уровне  $5 \text{ Бк/м}^2$ . Увеличение активности в растительном опаде наиболее интенсивно в первые 10 сут с момента начала вегетационного периода, что связано со слабой задерживающей способностью растений по отношению к аэральным выпадениям в этот период. В последующем, по мере увеличения  $K_3$ , возрастание активности  $^{131}\text{I}$  в растительном опаде, находящемся на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности, замедляется, достигает максимума на уровне  $\sim 7.5 \text{ Бк/м}^2$ , а затем начинает снижаться. Начало снижения совпадает по времени с моментом интенсивного возрастания активности в наземной фитомассе, что определено снижением величины поступления в растительный опад на фоне радиоактивного распада ранее накопленной активности. В дальнейшем по мере стабилизации величины задерживания активность радионуклида в растительном опаде на  $1 \text{ м}^2$  земной поверхности составляет  $\sim 5 \text{ Бк/м}^2$ .

В слабой степени от динамики  $K_3$  зависит накопление частиц хронических радиоактивных выпадений поверхностью дернины. При постоянных значениях  $K_3$  в течение всего срока моделирования происходит постоянное возрастание активности частиц выпадений до уровня  $\sim 2 \text{ Бк/м}^2$ , а при изменяющихся — максимум этого показателя приходится на 30–40-е сутки с момента начала вегетационного периода, постепенно понижаясь в дальнейшем. Последнее изменение обусловлено динамикой активности радионуклида в звене-доноре — растительном опаде.

Выполненные в данной работе прогнозные расчеты распределения  $^{131}\text{I}$  в компонентах лугового биогеоценоза носят оценочный характер и окончательные выводы о применимости модели можно сделать только после ее верификации. Однако оценка соответствия расчетных значений измеренным значениям активности в исследуемом биогеоценозе сопряжена с определенными сложностями, связанными с низкой интенсивностью осаждения радионуклидов из состава хронических радиоактивных выпадений и соответственно низким уровнем их содержания в окружающей среде. В частности, в 2018 г. величина годового выброса  $^{131}\text{I}$  АЭС с реакторами ВВЭР составила  $(3.6\text{--}16) \times 10^7 \text{ Бк}$ , с реакторами РБМК —  $< 1 \times 10^9 \text{ Бк}$ , и при этом данный радионуклид практически не зафиксирован в атмосферном воздухе зоны наблюдения [13]. Большой величиной годового выброса  $^{131}\text{I}$  характеризуется производство радиофармацевтических препаратов АО «НИФХИ им. Л.Я. Карпова» —  $2.2 \times 10^{12} \text{ Бк}$  при объемной активности радионуклида в атмосферном воздухе до  $6.7 \times 10^{-3} \text{ Бк/м}^3$ . Однако и в этом случае по данным многолетнего радиоэкологиче-

ского мониторинга суммарная  $\beta$ -активность проб почвы и растительности находится в пределах варьирования фоновой активности  $^{40}\text{K}$  [14]. К такому же выводу приходят в своих исследованиях и другие ученые [2, 13]. При этом следует отметить, что величина годового выброса  $^{131}\text{I}$  значительно превышает таковой показатель для всех продуктов деления, кроме радиоактивных инертных газов [13, 15], следовательно, активность в компонентах лугового биогеоценоза  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$  и ряда других радионуклидов будет существенно ниже. Таким образом, верификация и тестирование модели сопряжены со сложностью определения величин активности радионуклидов из состава хронических выпадений в луговом биогеоценозе.

Другой, не менее важной проблемой, чем получение результатов прогнозных расчетов распределения радионуклидов в луговом биогеоценозе, является неопределенность получаемых результатов. Связано это с тем, что наиболее часто в радиоэкологических исследованиях применяются точечные значения параметров переноса радиоактивных веществ между компонентами исследуемого биогеоценоза [4–6, 9]. Однако луговой биогеоценоз характеризуется варьированием характеристик растительного покрова по ряду показателей (высоте, биомассе, видовому составу растений) [12], с чем связана изменчивость коэффициента задерживания радионуклидов растениями. Неоднородность пространственного строения растительного яруса и растительного опада также определяет варьирование соответствующих постоянных очищения ( $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  соответственно). Представляется очевидным, что снижение неопределенности получаемых результатов может быть достигнуто путем проведения специальных экспериментальных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода математического моделирования для описания процессов перераспределения радионуклидов между компонентами биогеоценоза позволяет ответить на вопросы о потоках радиоактивных веществ, динамике активности радионуклидов в звеньях пищевых цепочек, а также возможных уровнях облучения биоты и человека. Особенно актуально это при хроническом поступлении радионуклидов в биогеоценоз, которое крайне сложно имитировать в природных условиях. Одним из критических типов природно-растительных комплексов в аспекте долговременного радиоактивного загрязнения являются луговые биогеоценозы. На основе принятых допущений луговой биогеоценоз рассмотрен в виде блок-схемы, содержащей три компартмента: надземная фитомасса растений, растительный опад и

поверхностный слой дернины. Математическое описание распределения радионуклидов между компартментами представлено системой линейных дифференциальных уравнений I порядка, решение которой получено двумя методами: операционного исчисления и замены дифференциальных уравнений на конечно-разностные аналоги. Применение обоих методов проиллюстрировано на модельном примере, характеризующем распределение частиц хронических радиоактивных выпадений, содержащих  $^{131}\text{I}$  в луговом биогеоценозе. Показана определяющая роль изменений коэффициента задерживания частиц радиоактивных выпадений надземной фитомассой в течение вегетационного сезона в динамике активности радионуклидов в системе “надземная фитомасса–растительный опад”. Выполненные модельные расчеты свидетельствуют о высокой значимости растительного опада как потенциального депо частиц хронических радиоактивных выпадений и его определяющей роли в формировании внешнего облучения биоты луговых биогеоценозов. Универсальность предлагаемой математической модели заключается в возможности ее применения для широкого класса поллютантов, поступающих из атмосферы в виде аэрозольных частиц. В дальнейшем рассмотренные в настоящей работе подходы к оценке распределения радионуклидов в луговых биогеоценозах будут направлены на снижение неопределенности расчетных результатов путем проведения специальных радиоэкологических исследований в зоне распространения хронических радиоактивных выпадений предприятий ядерной энергетики и промышленности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. СТО СРО-Г 60542954 00004-2015. Объекты использования атомной энергии. Основные требования к составу инженерных изысканий для строительства АЭС. Утв. 12.02.2015 г. М.: Госкорпорация Росатом, 2015. 64 с. [STO SRO-G 60542954 00004-2015. Obyekty ispolzovaniya atomnoy energii. Osnovnyye trebovaniya k sostavu inzhenernykh izyskaniy dlya stroitelstva AES. Utv. 12.02.2015 g. M.: Goskorporatsiya Rosatom, 2015. 64 s. (In Russian)]
2. Радиоэкологическая обстановка в регионах расположения предприятий Росатома / Под ред. И.И. Линге и И.И. Крышева. М.: САМ полиграфист, 2015. 296 с. [Radioekologicheskaya obstanovka v regionakh raspolozheniya predpriyatiy Rosatoma / Pod red. I.I. Linge i I.I. Krysheva. M.: SAM poligrafist, 2015. 296 s. (In Russian)]
3. ICRP 2008. Publication 108. Environmental Protection – the Concept and Use of Reference Animals and Plants // Ann. ICRP. 2008. V. 38 (4–6). 245 p.
4. Романов Г.Н. Ликвидация последствий радиационных аварий: Справочное руководство. М.: ИздАТ, 1993. 336 с. [Romanov G.N. Likvidatsiya posledstviy radiatsionnykh avariyy: Spravochnoye rukovodstvo. M.: IzdAT, 1993. 336 s. (In Russian)]

5. Generic Models for Use in Assessing the Impact of Discharges of Radioactive Substances to the Environment. Vienna: IAEA, 2001. 216 p.
6. *Георгиевский В.В.* Экологические и дозовые модели при радиационных авариях. Киев: Навук. думка, 1994. 235 с. [*Georgiyevskiy V.V.* Ekologicheskiye i dozovyye modeli pri radiatsionnykh avariyakh. Kiyev: Navukova dumka, 1994. 235 s. (In Russian)]
7. ICRP 2014. Publication 124. Protection of the Environment under Different Exposure Situations // *Annals of the ICRP*. 2014. V. 43. № 1. 60 p.
8. *Анохин В.Л.* Моделирование процессов миграции радионуклидов в ландшафтах. М.: Атомиздат, 1974. 143 с. [*Anokhin V.L.* Modelirovaniye protsessov migratsii radionuklidov v landshaftakh. M.: Atomizdat, 1974. 143 s. (In Russian)]
9. Сельскохозяйственная радиоэкология / Под ред. Р.М. Алексахина, Н.А. Корнеева. М.: Экология, 1992. 400 с. [*Sel'skokhozyaystvennaya radioekoloriya / Pod red. R.M. Alexakhina, N.A. Korneyeva.* M.: Ekoloriya, 1992. 400 s. (In Russian)]
10. *Пристер Б.С.* Проблемы сельскохозяйственной радиобиологии и радиоэкологии при загрязнении окружающей среды молодой смесью продуктов ядерного деления. Чернобыль: Институт проблем безопасности АЭС, 2008. 320 с. [*Prister B.S.* Problemy selskokhozyaystvennoy radiobiologii i radioekologii pri zagryaznenii okruzhayushchey sredy molodoy smesy produktov yadernogo deleniya. Chernobyl: Institut problem bezopasnosti AES, 2008. 320 s. (In Russian)]
11. Радиоактивное загрязнение территории Беларуси (В связи с аварией на ЧАЭС) / Под ред. В.И. Парфенова и Б.И. Якушева. Минск: Наука и техника, 1995. 582 с. [Radioaktivnoye zagryazneniye territorii Belarusi (V svyazi s avariyei na ChAES) / Pod red. V.I. Parfenova i B.I. Yakusheva. Minsk: Nauka i tekhnika, 1995. 582 s. (In Russian)]
12. *Базилевич Н.И., Титлянова А.А., Смирнов В.В. и др.* Методы изучения биологического круговорота в различных природных зонах. М.: Мысль, 1978. 185 с. [*Bazilevich N.I., Titlyanova A.A., Smirnov V.V. i dr.* Metody izucheniya biologicheskogo krugovorota v razlichnykh prirodnykh zonakh. M.: Mysl, 1978. 185 s. (In Russian)]
13. Радиационная обстановка на территории России и сопредельных государств в 2018 г.: Ежегодник. Обнинск: Росгидромет, ФГБУ “НПО Тайфун”, 2019. 324 с. [Radiatsionnaya obstanovka na territorii Rossii i sopredel'nykh gosudarstv v 2018 godu: Obninsk, Rosgidromet, FGBU “NPA Tayfoon”, 2019. 324 s. (In Russian)]
14. Отчет по экологической безопасности за 2016 год. М.: АО “Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л.Я. Карпова”, 2016. 33 с. [Otchet po ekologicheskoy bezopasnosti za 2016 god. M.: AO “Nauchno-issledovatel'skiy fiziko-khimicheskii institut im. L.Ya. Karpova”, 2016. 33 s. (In Russian)]
15. *Переволоцкая Т.В., Переволоцкий А.Н., Спиридонов С.И.* Кластерный анализ для оценки радиационного воздействия штатных выбросов АЭС на биоту // Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 1. С. 43–52. [*Perevolotskaya T.V., Perevolotskiy A.N., Spiridonov S.I.* Klasternyy analiz dlya otsenki radiatsionnogo vozdeystviya shtatnykh vybrosov AES na biotu // Radiatsiya i risk (Byulleten Natsionalnogo radiatsionno-epidemiologicheskogo registra). 2018. T. 27. № 1. S. 43–52. (In Russian)]

## Model of Distribution of Particles of Chronic Radioactive Fallout in Meadow Biogeocenosis

A. N. Perevolotsky<sup>a,\*</sup> and T. V. Perevolotskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

<sup>#</sup>E-mail: forest\_rad@mail.ru

The basic provisions and assumptions model distribution particles in chronic radioactive fallout in meadow biogeocenosis during the vegetation period are substantiated. On the basis of the compartment approach in meadow biogeocenosis, three compartments were identified: above-ground phytomass of plants, plant litter and surface layer of sod. The dynamics distribution particles of radioactive fallout between these compartments can be described by a system of linear differential equations of I order. The solution the system equations is obtained by the method of operational calculus and by replacing differentials with finite-difference analogues. Features application of the received decisions are considered. It is shown that the solution of the system of differential equations on the basis of operational calculus allows obtaining data on the distribution of deposited particles between the investigated compartments at any time. The system equations based on the replacement differentials by finite-difference analogues requires a sequential calculation the activity in the studied compartments for each moment of time. The range values parameters transfer particles radioactive fallout between compartments is given. Test examples of calculations the dynamics <sup>131</sup>I activity in the compartments meadow biogeocenosis in chronic radioactive fallout for the most typical transport parameters were performed. Calculations were made for the constant and variable values of the initial retention coefficient radioactive fallout particles by aboveground phytomass of meadow plants during the vegetation period. It was found that the maximum activity the radionuclide deposition particles is predicted for plant litter. The activity <sup>131</sup>I in the above-ground phytomass of plants increases in proportion to changes in the value of the initial retention coefficient, and at a constant value it reaches the plateau for 15–20 days from the beginning of radioactive fallout. In the surface layer the sod there is an accumulation of deposition particles as they move from the plant litter and above-ground plant phytomass.

**Keywords:** chronical radioactive fallout, radionuclides, decay constant, constant cleansing, density of the deposition, meadow biogeocenoses

**Мальцев Вячеслав Николаевич (26.07.1937–12.06.2020)**

12 июня 2020 г. на 83-м году жизни после непродолжительной тяжелой болезни от нас ушел коллега и товарищ Мальцев Вячеслав Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории № 4 – радиационной иммунологии и экспериментальной терапии радиационных поражений ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Вся трудовая, научная деятельность и общественная жизнь В.Н. Мальцева неразрывно связаны с нашим Центром. В системе ФМБА России (бывшем Третьем Главном управлении при Минздраве СССР) В.Н. Мальцев начал работу с февраля 1962 г., после окончания Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова, сначала в должности старшего лаборанта, затем младшего, старшего научного сотрудника и закончил будучи ведущим научным сотрудником.

В.Н. Мальцев занимался изучением зависимости доза–эффект в радиационной иммунологии и микробиологии и влиянием лечения на состоя-

ние иммунитета у облученных организмов. Принимал участие в исследованиях, проводившихся на Семипалатинском полигоне, обследовал больных, пострадавших при аварии на ЧАЭС. В период командировки в Ливию читал лекции и вел практические занятия с бакалаврами, готовящимися к получению звания магистра. В этих исследованиях была изучена микрофлора воды охлаждающего бассейна атомного реактора Ливийского центра ядерных исследований.

В.Н. Мальцевым опубликовано около 200 научных работ, из них 13 научных обзоров, семь монографий и учебников по микробиологии, пять патентов и авторских свидетельств. В.Н. Мальцев в 1983 г. опубликовал блестящую монографию по фундаментальным основам радиационной иммунологии “Количественные закономерности радиационной иммунологии” (Энергоиздат). В.Н. Мальцев был соавтором ряда коллективных монографий, посвященных вопросам действия радиоактивных изотопов на иммунитет, развитию дисбактериозов в облученном организме. Один из последних выпущенных им учебников для студентов высших учебных заведений – “Медицинская микробиология и иммунология” (М.: Практическая медицина, 2014). Несомненно, он обладал талантом педагога и исследователя. Подготовил пять кандидатов медицинских наук, ему присвоено звание профессора, являлся ответственным исполнителем по темам, выполнявшимся в лаборатории.

Признанием научной деятельности В.Н. Мальцева является включение его в Ученый совет по защите докторских и кандидатских диссертаций ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, награждение Серебряной и Бронзовой медалями ВДНХ за экспонаты, представленные в павильоне “Наука”. В.Н. Мальцев – ветеран труда, его деятельность отмечена медалями “Ветеран труда”, “В честь 850-летия Москвы”, знаками “Отличник здравоохранения” МЗ СССР, “Ветеран атомной промышленности”, “Участник ликвидации аварии на ЧАЭС” Государственной корпорации “Росатом”, нагрудным знаком А.И. Бурназяна ФМБА России, почетными грамотами и благодарностями Института биофизики и ФМБА России.

Мы потеряли выдающегося ученого в области радиационной микробиологии и иммунологии, прекрасного педагога и товарища.

*Коллеги и товарищи*

## Памяти Владимира Фёдоровича Михайлова



14 мая с.г. в больнице УКБ № 1 им. И.М. Сеченова с диагнозом коронавирусная пневмония на 74-м году жизни скончался Владимир Фёдорович Михайлов, заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна. Утрата горькая в своей неожиданности, случайности, но и какой-то предопределенности. Пришел вирус и собирает свою жатву, несмотря на заслуги, таланты, положение.

Ушел из жизни человек, посвятивший свою жизнь науке не по месту работы – по призванию. У него были “золотые” руки и светлая голова. За советом к нему шли многие, потому что он очень много знал и умел. Его любимым занятием было сидеть допоздна за компьютером и копаться в источниках, а потом как бы невзначай подкинуть нужную тебе статью, обзор. Он не стал защищать докторскую, хотя по гамбургскому счету был в своей области, конечно, академиком. К нему охотно шла молодежь, интуитивно чувствуя и важность направления, и потенциал руководи-

ля (одного специалиста и единомышленника на орбиту вывел, две кандидатские на выходе).

Владимир Фёдорович закончил медико-биологический факультет Московского медицинского института им. Н.И. Пирогова, это для таких, как он, глубоких и вдумчивых. В Институте биофизики он попал в лабораторию к Т.А. Фёдоровой, потом был правой рукой у В.К. Мазурика, а потом сам возглавил лабораторию. Он развернул самое актуальное уже многие годы направление в медико-биологическом кластере – молекулярно-генетические исследования по экспрессии различных генных продуктов, прежде всего в аспекте радиогенного рака, поиска биомаркеров его развития, лечения, возможных осложнений (в том числе в сотрудничестве с клиницистами), поиска противолучевых средств третьего поколения (антионкогенных).

В сотрудничестве с коллегами им была показана зависимость устойчивости/чувствительности клеток человека при различных патологиях, включая онкологию, от особенностей генотипа. Эти данные позволили определить диагностические и прогностические показатели заболевания при радиотерапии опухолей.

Отдельный раздел исследований был посвящен изучению антимутагенов природного (тионин, тимоквин, ретинол и др.) и синтетического (краун-соединения) происхождения, впервые показаны не только их защитные свойства при действии радиации и тяжелых металлов, но и особенности влияния на экспрессию генных продуктов в нормальных и злокачественных клетках человека.

Особое внимание Владимир Фёдорович сосредоточил на регуляторах генов – некодирующих РНК (микроРНК и длинных некодирующих РНК), которые могут служить как диагностическими, так и прогностическими показателями. Выявление различий в реакции нормальных и злокачественных клеток при малых дозах радиации по критерию экспрессии генов и микроРНК позволило сформулировать новый подход к радиотерапии опухолей с использованием радиоадаптивного ответа.

Когда в радиобиологическом отделе Центра им. А.И. Бурназяна организовалось комплексное изучение отдаленных последствий низкоэнергетического облучения мышей, исследования Владимира Фёдоровича заняли чуть ли не центральное положение в этой тематике. Именно с ними

были связаны надежды на прорыв, даже на открытие. Он так мечтал нащупать связь между изменением генетической информации и реализацией онкогенной трансформации. И его мечты были небеспочвенны. Первая ласточка появилась, когда на 10-м месяце после облучения образовались опухоли и были выявлены связи между изменением активности генов и выходом лимфом. Открывались реальные пути проверки самых смелых гипотез. Но не срослось. Точно рок преследовал этот многообещающий проект. Закрылся арендованный облучатель, на приобретение собственного не нашлось денег и опыты прекратились. Ну, а потом пришел вирус и довершил дело.

Исследования, которые проводил Владимир Фёдорович, дали богатую жатву. Вместе с соавторами им было опубликовано за 15 лет около 50 научных работ. На протяжении последних 12 лет он был соавтором по грантам РФФИ, Президиума РАН (Фундаментальные науки в медицине), гранту “АО Наука и инновации” ГК Росатом (2019–2021 гг.).

В лице Владимира Фёдоровича отечественная радиобиология понесла серьезную утрату. Для людей, работавших и сотрудничавших с ним, делом чести становится сохранение созданного им в Центре А.И. Бурназяна направления исследований. Подспорьем в этом им будут служить его труды, идеи, наработки и планы.