

СОДЕРЖАНИЕ

Том 61, номер 2, 2021

Радиационная биофизика

Методология использования спектроскопии ЭПР в анализе физико-химических механизмов радиогенных повреждений организма животных и человека

В. Л. Шарыгин

117

Радиационная эпидемиология

Риск заболеваемости артериальной гипертензией в когорте работников ПО “Маяк”, подвергшихся хроническому облучению

Т. В. Азизова, К. В. Брикс, М. В. Банникова, Е. С. Григорьева

133

Клеточная радиобиология

Цитостатические и радиомодифицирующие эффекты D-глюкозамина на клетках человека в культуре

*Н. Я. Гильяно, М. М. Дуботолова, Л. А. Носкин,
Л. В. Коневега, С. И. Степанов, Ф. М. Ибатуллин*

144

Модификация радиационных эффектов

Сравнительная эффективность сингенных культивированных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) и свежeweделенных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани при лечении тяжелых местных лучевых поражений в эксперименте

*Ю. Б. Дешевой, В. Г. Лебедев, Т. А. Насонова,
О. А. Добрынина, А. В. Лырщикова, Т. А. Астрелина,
Б. Б. Мороз*

151

Влияние препарата супероксиддисмутазы “Рексод” на число КОЕ_С у облученных мышей

*А. В. Аклеев, И. А. Шапошникова, И. В. Чурилова,
А. Н. Гребенюк, Е. А. Пряхин*

158

Неионизирующие излучения

Поведенческая активность и уровень кортикостерона в сыворотке крови мышей в динамике семидневного воздействия наносекундным импульсным микроволновым излучением

*А. В. Самойлова, М. А. Большаков, Л. П. Жаркова,
А. А. Гостюхина, О. П. Кутенков, В. В. Ростов*

167

Анализ результатов длительного воздействия ЭМИ на когнитивные функции потомства облученных крыс

В. В. Панфилова, О. И. Колганова, О. Ф. Чибисова

174

Радиобиология растений

Действие γ -излучения в малых дозах на цитогенетические параметры проростков семян лука *Allium cepa* в экспериментах разной длительности

А. В. Зуева, Е. А. Трофимова, Д. В. Дементьев, А. Я. Болсуновский 180

Радиоэкология

Цитогенетические и цитотоксические эффекты действия ионизирующего излучения на эритроциты крови рыб, обитающих в водоемах на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника

А. В. Гулаков, Д. Н. Дроздов, Д. Н. Иванцов 189

Радионуклиды

Радионуклиды в основных компонентах и приозерных почвах экосистемы озера Малые Кирпичики (ВУРС)

В. В. Дерягин, С. Г. Левина, А. В. Аклеев, А. А. Сутягин 197

История науки

На заре радиационной генетики

Г. Б. Смирнов 206

Хроника

Международная научно-практическая конференция “Ядерно-физические исследования и технологии в сельском хозяйстве” (к 50-летию со дня образования ФГБНУ ВНИИ радиологии и агроэкологии)

С. И. Санжарова, О. Э. Пронина 214

К 90-летию со дня рождения Фёдора Анатольевича Тихомирова (1931–2003)

С. В. Мамихин, А. И. Щеглов 220

Потери науки: Чернов Юрий Николаевич (5 ноября 1937 г. – 1 января 2021 г.)

И. Э. Есауленко, М. В. Васин, И. Б. Ушаков 223

Contents

Vol. 61, No. 2, 2021

Radiation Biophysics

The Methodology of EPR Spectroscopy using in Analysis of Physical and Chemical Mechanisms of Radio-Genetics Damages in Animal and Human Organisms

V. L. Sharygin

117

Radiation Epidemiology

Hypertension Incidence Risk in a Cohort of “Mayak” PA Workers Exposed to Radiation over Prolonged Periods

T. V. Azizova, K. V. Briks, M. V. Bannikova, E. S. Grigoryeva

133

Cellular Radiobiology

Cytostatic and Radiomodifying Effects of D-Glucosamine on Human Cells in Culture

*N. Ya. Giliano, M. M. Dubotolova, L. A. Noskin,
L. V. Konevega, S. I. Stepanov, F. M. Ibatullin*

144

Modification of Radiation Effects

Comparative Effectiveness of Singful Cultivated Mesenchymal Stem Cells (MMSC) and Freshly Isolated Cells of Stromal-Vascular Fraction (SVF) of Fat Tissue in the Treatment of Severe Local Radiation Lesions in the Experiment

*Yu. B. Deshevoi, V. G. Lebedev, T. A. Nasonova, O. A. Dobrynina,
A. V. Lyrshnikova, T. A. Astrelina, B. B. Moroz*

151

The Influence of the Superoxide Dismutase Preparation “Rexod®” on Survival of CFUs in C57BL/6 Mice

*A. V. Akleyev, I. A. Shaposhnikova, I. V. Churilova,
A. N. Grebenyuk, E. A. Pryakhin*

158

Non-Ionizing Radiation

Behavioral Activity and Cortycosterone Level in the Mice Blood Serum During the 7-day Exposure to Nanosecond Microwave Pulses

*A. V. Samoylova, M. A. Bolshakov, L. P. Zharkova,
A. A. Gostyuhina, O. P. Kutenkov, V. V. Rostov*

167

Analysis of the Result of the Prolonged Influence of EMP on the Cognitive Functions of the Progeny of Irradiated Rats

V. V. Panfilova, O. I. Kolganova, O. F. Chibisova

174

Radiobiology of Plants

The Effect of Low-Dose γ -Radiation on Cytogenetic Endpoint of Onion (*Allium cepa*) Seedlings of Various Durations

A. V. Zueva, E. A. Trofimova, D. V. Dementyev, A. Ya. Bolsunovsky

180

Radioecology

Analysis of Cytogenetic and Cytotoxic Effects of Reservoirs the Territory of Polesky State Radiation-Ecological Reserve

A. V. Gulakov, D. N. Drozdov, D. M. Ivantsou

189

Radionuclides

Radionuclides in the Major Components and Lakeside Soils of the Ecosystem of the Lake Malye Kirpichiki (EURT)

V. V. Deryagin, S. G. Levina, A. V. Akleev, A. A. Sutyagin

197

History of Science

At the Dawn of Radiation Genetic

G. B. Smirnov

206

Chronicle

International Scientific and Practical Conference
“Nuclear Physics Research and Technologies in Agriculture
(To the 50th Anniversary of the Foundation of the Russian Institute
of Radiology and Agroecology)”

S. I. Sanzharova, O. E. Pronina

214

To the 90th Anniversary of Fyodor Anatolyevich Tikhomirov (1931–2003)

S. V. Mamikhin, A. I. Shcheglov

220

Losses of Science: Chernov Yuri Nikolaevich (5.10.1937–1.01.2021)

I. E. Esaulenko, M. V. Vasin, I. B. Ushakov

223

РАДИАЦИОННАЯ БИОФИЗИКА

УДК 543.429.22:577.3:539.1.047

МЕТОДОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ ЭПР В АНАЛИЗЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАДИОГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. В. Л. Шарыгин^{1,*,**}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

*E-mail: sharygin@chph.ras.ru

**E-mail: sharygin2011@mail.ru

Поступила в редакцию 13.08.2020 г.

После доработки 10.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Исследованы молекулярные механизмы синтеза дезоксирибонуклеотидов, ДНК и белков в тканях кроветворных органов, а также изменения пулов Fe^{3+} -трансферрина (Fe^{3+} -ТФ) и Cu^{2+} -церулоплазмина (Cu^{2+} -ЦП) и внеклеточной ДНК в крови и плазме животных как под действием γ -радиации, так и при применении радиопротекторов. Контролируемые методом ЭПР изменения пулов Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП в крови, содержания внДНК могут использоваться в качестве маркеров радиочувствительности организма. В механизме противолучевого эффекта индралина и индометовена существенным является повышение активности рибонуклеотидредуктазы и индуцирование синтеза дезоксирибонуклеотидов, необходимых для эффективной репарации повреждений и синтеза ДНК в клетках радиочувствительных органов. Использование ЭПР-технологий позволило обосновать дозы и режимы введения радиопротекторов для получения оптимальной радиозащиты.

Ключевые слова: γ -радиация, метод ЭПР, ДНК, белки, дезоксирибонуклеотиды, Fe^{3+} -трансферрин, Cu^{2+} -церулоплазмин, внеклеточная ДНК, радиочувствительность организма, радиопротекторы

DOI: 10.31857/S0869803121020132

“Для натуралиста все дело — в методе”, — утверждал великий физиолог И.П. Павлов, а по уточнению другого Нобелевского лауреата Л.Д. Ландау: “Метод даже важнее открытия, потому что можно постоянно улучшать его, в зависимости от поставленной задачи”. Сегодня уже абсолютно ясно, что также прав оказался и лауреат Нобелевской премии 2002 г. по физиологии и медицине Сидней Бреннер: “Прогресс в науке зависит от новых методик, новых открытий и новых идей, и, вероятно, именно в таком порядке”. Следование этим принципам и составило стратегию исследования закономерностей динамического ответа молекулярно-клеточных систем жизнеобеспечения на воздействие ионизирующих излучений и установление комплекса ЭПР-биомаркеров лучевого поражения организма. Речь идет о методологическом обосновании анализа возможностей прогнозирования последствий радиационных эффектов на основе биофизико-генетического подхода их истолкования и эмпирического обобщения. Термин В.И. Вернадского означает утверждения, которые не противоречат современному знанию. С точки зрения физика, эти обобщения позволяют описать неизвестное, дают основу для

логических построений с учетом имеющихся фактов, обеспечивают другое видение и интерпретацию предмета исследования. Доминантами междисциплинарных исследований стали определение характерных черт и количественная оценка формирования организменного метаболического адаптивного системного SOS-ответа: спектр биофизических, биохимических и сопряженных цитогенетических показателей, необходимых для анализа регуляторной роли систем репарации ДНК в условиях радиационного окислительного стресса млекопитающих.

Биофизический подход сложился в задачу выяснения первичных пусковых механизмов повреждения ДНК и роли репарационного SOS-ответа в условиях действия ионизирующих излучений различной силы и длительности. Важно было установить “с начала причинных цепей” (по выражению Н.В. Тимофеева-Ресовского) природу реализации мутационного процесса и первичных нарушений репликации и репарации ДНК и их роль в развитии цитогенетических изменений, определяющих стохастическое возникновение экпатологий в условиях радиогенных повреждений организма. Логическое осмысление законо-

мерностей динамики мультипараметрических SOS-реакций молекулярно-клеточных систем, понимание причинной обусловленности и природы фенотипики поможет в дальнейшем получить клинически значимые тесты адекватной адаптации или негативных последствий при действии ДНК-тропных агентов на организм животных и человека. С этих позиций, используя возможности метода ЭПР-спектроскопического анализа биообъектов, проводили поиск метаболических биомаркеров радиационного поражения.

ОБОСНОВАНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ВЫБОР МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Точность копирования ДНК в процессах репликации и репарации зависит не только от активности ферментов, но и определяется сбалансированным синтезом дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), который обеспечивает ключевой регуляторный компонент в цепи синтеза – тирозильный свободнорадикальный железосодержащий фермент рибонуклеотидредуктаза (RR), идентифицированный нами *ex-vivo* методом ЭПР в тканях и органах животных [1, 2]. В серии наших работ представлены результаты, свидетельствующие о регулирующей роли изменения активности рибонуклеотидредуктазы в уменьшении пулов четырех типов dNTP и их дисбаланса в условиях метаболической генерации повреждений ДНК в органах кроветворения [3–7]. Вектор ЭПР-исследований был направлен на выяснение потенциально важных, главных звеньев механизмов регуляции активности ферментной системы RR и ее участие в биохимической адаптации и функционировании системы SOS-репарации повреждений ДНК. Современный ЭПР-подход в изучении функциональной роли и анализа временной динамики свободнорадикальных метаболических парамагнитных клеточных систем позволил установить факты наличия адаптивного системного SOS-ответа на организменном уровне. Вопрос о многофакторной природе интегрального SOS-ответа системы *de novo* синтеза дезоксирибонуклеотидов и реакций ДНК, РНК и белков в условиях общего облучения организма млекопитающих в значительной степени остается открытым.

Напомним, что в экспериментах *in vitro* на изолированных тканевых и клеточных системах гипотеза SOS-репарации в наиболее полном виде была разработана и доказана ранее зарубежными авторами [8, 9]. Открытие энзиматической системы репарации ДНК во многом определило значение SOS-реакции клеточных систем в поддержании стабильности генома. В работах авторы обращали внимание, что в экстремальных условиях SOS-ответ связан с дисбалансом пулов dNTP, нарушением энзиматической системы синтеза и ре-

парации ДНК, нарушением макромолекулярной структуры ДНК, формированием гипермутаций, снижением качества SOS-репарации, появлением двойных разрывов и возможной гибелью клеток системы кроветворения [10, 11]. Установлено, что обеспечение синхронности реакций гидролиза и ресинтеза нуклеотидов лежит в основе эффективной репарации брешей в цепях ДНК, возникающих из-за влияния эндогенных спонтанных или экстремальных экопатогенных факторов внешней среды. Реализация первичного поражения и полноценная репарация метаболических брешей на фоне дисбаланса синтезов dNTP, ДНК и белков замедляются и нарушаются в результате преобладания скорости гидролиза нуклеотидов, вследствие чего быстро развивается деградация ДНК, и может возникнуть опасность для жизни клеток [12, 13]. Изложенные факты касаются клеточной организации и функционирования составной части организма в условиях опытов *in vitro*, но будущее исследование – за организменным уровнем.

Мы полагаем, что современный биофизический подход к изучению вопросов на уровне целостного организма открывает возможности разработку экспресс-методов тестирования ранних повреждений системы SOS-репарации ДНК, во многом определяющих конечные эффекты радиогенных повреждений организма. В этих условиях необходимо вычленение из общих, взаимосвязанных цитогенетических изменений, реального количественного звена радиационно-индуцированных метаболических показателей, обуславливающих конкретные этапы постлучевого периода у экспериментальных животных.

Комплексную оценку совокупности данных ЭПР-исследований радикального фермента RR, изменения биосинтезов белка и ДНК радиоизотопными методами, биохимических показателей активности ряда ферментов в условиях действия ионизирующих излучений сопоставляли с результатами параллельного цитогенетического анализа крови в тех же экспериментальных моделях. Это и позволило адекватно судить о радиационно-индуцированных первичных поражениях ДНК, формировании и развитии мутационных процессов в пролиферирующих клетках, тканях и органах системы кроветворения млекопитающих [14, 15].

Попытки контролировать в полноценных опытах на организме методом ЭПР режимы биосинтеза внутриклеточных предшественников синтеза ДНК обозначили новые задачи по выяснению роли первичных физико-химических механизмов в повреждающих и восстановительных реакциях синтеза ДНК, РНК и белков в условиях γ -облучения. Как упоминалось выше, изучая динамику метаболических реакций с участием сво-

бодных радикалов и парамагнитных металлокомплексов в крови и тканях животных, установили важный феномен: дозозависимый SOS-репарационный измененный ответ гомеостатических систем жизнеобеспечения облученного организма [3–5].

Количественная оценка динамики свободно-радикальной активности фермента RR в тканях кроветворной системы *ex-vivo* позволила выстроить определенную цепочку логических заключений о значении возникающего дисбаланса нуклеотидов dNTP, служащих субстратами ДНК-полимераз в механизмах индукции радиационного мутагенеза и возникающих перестроек и нарушений в системах SOS-репарации ДНК в экстремальных условиях организменного радиационного окислительного стресса. Очевидно, в защитной SOS-реакции значительная роль принадлежит интегральной оценке последствий дисбаланса пулов нуклеотидов и комплекса молекулярных гомеостатических реакций в системе обеспечивающих синтез ДНК, РНК и белков [16, 17]. Результаты экспериментов позволили заключить, что в неблагоприятной для организма SOS-ситуации следствием дисбалансного мутагенеза является возможная индуцированная мутабельность генома, характеризующаяся увеличением частоты спонтанных мутаций, проявляющихся отдаленными эффектами в последующих поколениях клеток и снижении их жизнеспособности. Следует отметить, что последствия резкого и длительного по времени дисбаланса могут быть одним из начальных пусковых звеньев злокачественного перерождения клеток. Известно, что запрограммированное самоубийство клеток (апоптоз) в пролиферирующих тканях млекопитающих также связано с длительным и глубоким нарушением процессов репликации и репарации ДНК.

ЭПР-АНАЛИЗ РАННИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ РАДИОГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Методология исследований при изучении интегрального SOS-ответа ферментных систем целостного организма нацелена на рассмотрение системного организменного ответа, связанного с нарушением баланса внутриклеточных синтезов ДНК, РНК, белков, dNTP, повышающих вероятность возникновения генных и структурных мутаций в условиях общего γ -облучения. И на этой основе поставлена задача анализа информации о количественной фазно развивающейся взаимной обусловленности динамики энергетических и биосинтетических реакций в организме при развитии радиационного окислительного стресса [17, 18]. Важным результатом работы является выяснение “пороговых эффектов” и резервных возможностей гомеостатических реакций, отражающих

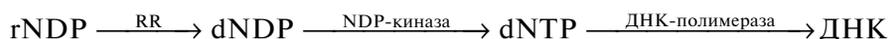
изменения состояний организма, в условиях линейно нарастающего по силе и длительности воздействия ионизирующих излучений (ИИ). Кроме того, принципиальное значение имеет предоставление доказательств о роли мутационного процесса и взаимосвязанных механизмов репарации ДНК в радиационно-индуцированных повреждениях генома, а также в возникновении метаболических последствий, приводящих к пролиферативным заболеваниям и опухолевому росту. Использовали комплекс взаимодополняющих методов и оценивали адаптивный системный SOS-ответ ферментных систем защиты на уровне целого организма по динамике радиационно-индуцированных молекулярно-генетических повреждений в тканях и органах при воздействии различных доз γ -радиации.

Интенсивность свободнорадикального сигнала радикального фермента RR, регистрируемого ЭПР-методом в системах с высокой пролиферативной активностью, и, в том числе, органах кроветворения, пропорциональна его каталитической активности и изучена нами в динамике при действии на организм ИИ разной мощности дозы и различных экзогенных генотоксикантов [1–5, 14–16]. Спектр ЭПР активной RR представляет собой дублет со значением сверхтонкого расщепления $a = 20$ Гс и g-фактором 2.005 и регистрируется при значении микроволновой мощности, равной 200 мВт. Образцы измеряли при 77 К на радиоспектрометре “ER-220D” (Bruker, Германия) с использованием стандартной методики накопления и анализа спектров на мини-ЭВМ “Aspect-2000”. В монографии М.К. Пулатовой и соавт. подробно описана методология наших исследований [19]. Для контроля RR-активности использовали быстрозамороженные в жидком азоте образцы крови и ткани кроветворных органов. Биосинтетические реакции систем макромолекулярного синтеза оценивали с помощью радиоизотопных методов по временным и дозозависимым пострadiационным изменениям интенсивности биосинтезов ДНК, РНК и белков. Количественные ЭПР-измерения уровня каталитической активности рибонуклеотидредуктазы *ex-vivo* позволили анализировать и судить о пострadiационных изменениях синтеза dNTP в активно пролиферирующих тканях системы кроветворения (костный мозг, селезенка, тимус, печень). Кроме того, методом ЭПР контролировали показатели, характеризующие энергетические, детоксицирующие, антиокислительные, свойства крови, антирадикальную активность плазмы, изменения пулов Fe^{3+} -трансферрина (Fe^{3+} -ТФ) и Cu^{2+} -церулоплазмина (Cu^{2+} -ЦП) в крови и уровне адреналина и метгемоглобина. Наиболее высокочувствительными и информативными, позволяющими охарактеризовать влияние малых доз облучения и индивидуальную радиочувствитель-

ность организма, служили показатели изменения пулов плазменных белков Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП. Биохимическими методами определяли изменения содержания эстрадиола и тестостерона в плазме, клеточную активность супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы, антиокислительную активность крови, уровень внеклеточной низкомолекулярной фракции ДНК в плазме ($_{вн}ДНК$), ингибиторную активность α_2 -макроглобулина в крови мышей и собак.

Особый интерес представляют вопросы ЭПР-анализа механизмов участия фермента RR в SOS-ответе и в репарационных реакциях повреждений

ДНК; динамика его каталитической активности при действии на организм ионизирующих излучений разной мощности дозы и различных экзогенных генотоксикантов. Фермент RR контролирует скорость-лимитирующую стадию в синтезе ДНК: синтез 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфатов (dNDP), катализируя замещение ОН-группы в положении 2'-рибозного остатка на атом водорода и образуя 2'-дезоксипроизводные. Метаболический путь включения рибонуклеозид-5'-дифосфатов (rNDP) в молекулу ДНК представлен:



Синтез dNTP строго контролируется именно ферментом RR, поскольку NDP-киназа не лимитирует скорость этой реакции. На этапе, катализируемом RR, обеспечивается сбалансированное поступление четырех типов dNTP (аденин, гуанин, тимин, цитозин) для репликации и репарации ДНК, от величины пулов которых и их соотношения зависят как точность копирования, так и скорость синтеза ДНК. Установлено, что в условиях дисбаланса синтеза предшественников (dNTP) нарушается структурная стабильность макромолекул ДНК, образуются метаболические бреши в цепях ДНК и возрастает “нагрузка” на ферментные системы репарации [12, 13, 20].

Мы отмечали, что на активно пролиферирующих клеточных культурах детальная оценка роли фермента RR, как регулятора “качества синтеза” ДНК, продемонстрирована во многих экспериментах *in vitro* и свидетельствует об универсальном характере SOS-реакций организма на лучевое поражение. Именно в систематических ЭПР-исследованиях получена возможность судить о результативности подхода, позволяющего на организменном уровне контролировать вполне определенные и жизненно важные молекулярно-клеточные процессы. В ходе проведенных нами работ установлено, что SOS-ответ включает раннюю активацию систем синтеза dNTP, длительность которой не более 1 ч после воздействия агента на организм. В течение первого часа после γ -облучения животного максимальная активация синтеза dNTP в тканях сопровождалась мощным повышением интенсивности синтезов РНК, ДНК и белков в радиочувствительных активно пролиферирующих клетках кроветворных органов. Увеличение числа транскрипционных факторов во время SOS-ответа приводит к активации трансляции и накоплению пула фермента RR, что обеспечивает повышенный синтез dNTP. Резкая активация биосинтеза РНК и одновременный рост активности RR однозначно свидетельствуют

о стимулирующем эффекте и об интегральном повышении мощности систем синтезов ДНК, РНК и всего белоксинтезирующего аппарата [3, 4]. Экспериментально обнаружено существование зависимости системной ответной реакции на дозы облучения. Из установленных в опыте взаимосвязей функций “селективного эффекта” с генетическими элементами мы пришли к выводу, что основным стимулом для SOS-активации синтеза dNTP в условиях радиационного воздействия является необходимость экстренной репарации увеличенного объема радиационно-индуцированных повреждений ДНК [5].

В ответе клеточных систем на облучение за SOS-активацией синтезов РНК и возрастанием пулов dNTP следовала закономерная стадия ингибирования RR-активности и синтезов РНК, ДНК и белков. Показательно, что в период от 3–24 ч синтеза dNTP и ДНК в селезенке облученных мышей были подавлены на 40 и 80–85% от контроля соответственно. Использование ЭПР в одном эксперименте с радиоизотопными и биохимическими методами позволило заключить, что последствия ингибирования и возникновения ошибок транскрипции и трансляции, дефектный репликативный синтез и неполноценная репарация ДНК при воздействии γ -радиации на организм проходят с участием нарушенного соотношения (дисбаланс) пулов четырех типов dNTP. Эффективная регуляция синтеза ДНК со стороны RR может быть нарушена под влиянием различных факторов, и особенно активных форм кислорода, что нашло подтверждение в ряде работ [11–13].

Комплекс факторов радиационного окислительного стресса может определять функциональную роль возникающих метаболических изменений, приводящих к увеличению суммарного выхода спонтанных мутаций и к появлению дефектов в молекуле ДНК. Под действием даже слабо выраженной степени ингибирования фермен-

та RR имеет место значительное подавление синтеза ДНК, что обусловлено установленной в опытах сигмоидальной зависимостью между этими показателями. Поэтому даже незначительное изменение концентрации dNTP или их дисбаланс вызывают возникновение существенного подавления синтеза и репарации ДНК [14, 15]. Опыты свидетельствуют, что разрывы, обнаруживаемые вслед за облучением в ДНК клеток млекопитающих, уже через 1 ч полностью исчезают (репарируются). И, тем не менее, через 3 ч регистрируется новая волна разрывов в делящихся клетках при резком угнетении репликативного синтеза. В рамках адаптивного SOS-каскада взаимозависимых реакций уменьшение RR-активности реально может быть связано с зарегистрированным подавлением синтеза белков на 85% в органах облученных животных [16]. Показано, что регуляция активности RR осуществляется посредством синтеза *de novo* или деградации его субъединицы B2 – коротко живущего белка M2B, время жизни которого всего 3 ч. Дисфункция и деградация системы RR в условиях подавленного синтеза белков означают, что и пул B2, а также пул фермента RR не восстанавливаются. И это приводит к ингибированию синтеза ДНК [17, 18, 20].

Вторая волна активации синтеза dNTP, ДНК и белков связана с развитием компенсаторно-восстановительных организменных реакций, направленных на репарацию клеточных структур. Интенсивность этих реакций растет линейно с дозой облучения, (вплоть до летальной), при которой ее значение настолько велико, что возникает риск срыва метаболической защитной SOS-реакции организма и, в том числе, – ингибирование скоростей синтеза ДНК, РНК и белков из-за истощения биосинтетического и биоэнергетического потенциалов клеток [3, 4].

Биофизический подход позволил анализировать режимы возникновения индукции мутагеназа по характеру динамических изменений активности RR и изменению пулов плазменных белков Fe³⁺-трансферрина (Fe³⁺-ТФ) и Cu²⁺-церулоплазмина (Cu²⁺-ЦП), используемых в качестве метаболических маркеров SOS-ответа [5].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТАЦИОННЫХ SOS-РЕАКЦИЙ И СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА

В свете приведенной выше оценки системного нарушения цитогеномного гомеостаза и, в частности, этапов индукции репарации ДНК, попытались обосновать свой методический подход к анализу способов оценки радиозащитного действия ряда соединений. В опытах радиозащиты

организма использовали концептуальную основу цитогенетических реакций системы SOS-ответа для прогностической оценки способности перспективных радиопротекторов предотвращать переход компенсаторно-восстановительных реакций в период развития постлучевого синдрома в гиперформу [17, 18].

Наличие индикаторов лучевого поражения обеспечивает возможность раннего выявления радиогенных молекулярно-клеточных повреждений, расширения представлений о природе молекулярно-клеточных мишеней и механизмов радиогенных эффектов. Анализ результатов наших опытов о временных изменениях клеточных SOS-реакций, индуцированных облучением (в дозах от 0.25 до 16 Гр), свидетельствует, что возрастание частоты генных мутаций и мутаций хромосом, несомненно, в определенной степени, связано с механизмами возникающего дисбаланса нуклеотидов. Подтверждением важной функциональной роли RR в фенотипических мутациях является существование корреляционной связи между активностью этого фермента репарации и фазными изменениями в крови ряда показателей SOS-реакции организма и, в частности, пулов активных плазменных белков Fe³⁺-трансферрина (Fe³⁺-ТФ) и Cu²⁺-церулоплазмина (Cu²⁺-ЦП).

В костном мозге, селезенке, тимусе синтез dNTP и ДНК зависит от колебания содержания железа в клетках, так как субъединица M2 рибонуклеотидредуктазы (Fe³⁺-RR) содержит два иона железа. Обеспечение клеток ионами Fe³⁺ осуществляет железотранспортный белок плазмы крови Fe³⁺-трансферрин. Механизм переноса ионов включает стадию образования комплекса Fe³⁺-ТФ с его рецептором. Блокада рецепторов, в ответ на облучение, приводит к уменьшению пулов Fe³⁺-ТФ в крови, в зависимости от дозы облучения, и к подавлению синтеза dNTP и ДНК, а также и железозависимых и железосодержащих белков, в том числе митохондриальных [20, 21]. Отметим, что другой важнейший многофункциональный белок плазмы Cu²⁺-церулоплазмин (Cu²⁺-ЦП) окисляет ионы Fe²⁺ до Fe³⁺ и, благодаря этой ферроксидазной активности, способствует включению ионов железа в апотрансферрин. Кроме того, этот транспортный белок обеспечивает клетки ионами Cu⁺. К тому же, Cu²⁺-ЦП, обладая аминоксидазной активностью, регулирует концентрацию биогенных аминов, а также является основным антиоксидантом крови, благодаря его супероксиддисмутазной и пероксидазной активностям [22].

Изменения пулов плазменных белков в крови были использованы для контроля динамики синтезов ДНК, dNTP и белков в качестве маркеров, отражающих развитие фенотипических молекулярно-клеточных компенсаторно-восстанови-

тельных реакций. Совокупность биомаркеров позволила судить о временных и дозовых изменениях индивидуальных реакций при действии радиационных факторов на организм. Было обнаружено, что фазные изменения пулов Fe^{3+} -ТФ в крови облученных собак однотипны и по времени их регистрации совпадают при всех использованных дозах облучения (0.25–16.0 Гр). Существует мнение, что эти закономерные динамические аспекты клеточных систем находятся под жестким контролем эволюционного отбора, направленного против дестабилизации генома: способствуют “сохранению целостности клеточной организации, предотвращению сбоя и обеспечению контроля за возможными повреждениями” [23].

В ходе наших опытов были зарегистрированы максимальные значения пула Fe^{3+} -ТФ на 2-е и 6-е сутки от момента начала γ -облучения. Последующие повышения пулов Fe^{3+} -ТФ закономерно регистрировали с 10-х по 15-е, с 20-х по 27-е и с 45-х по 60-е сутки. И они были менее интенсивными и растянутыми во времени. Важно, что в тех же самых опытах регистрировали идентичную динамику и фазовую зависимость изменений пулов Cu^{2+} -ЦП и содержания метНб, супероксиддисмутазную активность, антипротеолитическую активность α_2 -макроглобулина.

В опытах на собаках, для отражения показателей индивидуальной сложной биологической системы, методом ЭПР оценивали интенсивность организменных интегральных реакций на разные дозы облучения по величине прироста пула Fe^{3+} -ТФ на 2-е (или на 6-е) сутки от его минимального значения, которое регистрировали через 9 ч после облучения, т.е. $\Delta I = I_{\text{макс}} - I_{\text{мин}}$. Было обнаружено, что величина ΔI линейно росла с увеличением дозы, вплоть до летальной. Характерно, что при дозах, превышающих летальную, увеличения ΔI не наблюдали. В экстремальных условиях действия больших доз облучения, когда “гиперответ” переводит организм в состояние предельного “биохимического напряжения”, возникает “летальный удар” — срыв реакций адаптации и цитогенетических внутриклеточных процессов. Это неизбежно сопровождается истощением энергетических, синтетических, нейрогуморальных и иммунных резервов, вызывающих репродуктивную гибель клеток, приводящую к необратимым пострадиационным изменениям в организме.

Отметим, что для оценки методом ЭПР неспецифической компоненты резистентности, определяющей исходное состояние, использовали отношение $(\text{Fe}^{3+}\text{-ТФ/МетНб})_{\text{исх}}$, которое учитывает синтез dNTP и других железосодержащих белков и убыль функционального гемоглобина в периферической крови. Для практически здоровых собак контрольной группы величины этого показателя были в пределах 0.9–1.6. Для собак в

“активированном” состоянии (например, из-за стресса или приема лекарств) значение $(\text{Fe}^{3+}\text{-ТФ/МетНб})_{\text{исх}}$ было больше, а в “угнетенном” состоянии — меньше указанных значений. Комплексная оценка этой группы собак в экстремальных опытах характеризовалась наибольшими отклонениями от контроля. Именно у этих животных были зарегистрированы повышенная радиочувствительность и интенсивность организменной адаптивной реакции, неадекватная дозе облучения. Кроме того, во всех случаях индивидуальных отклонений от контроля повышение пула Fe^{3+} -ТФ не отвечало линейной зависимости доза/эффект и не предотвращало возникновение сбоев устойчивости к повреждающему действию γ -облучения [24].

Реакции организма остаются неизменными по своей характерной фазовой картине и при облучении в малых дозах (0.25 и 0.5 Гр). Регистрировалось повышение пулов Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП, адреналина и гемоглобина, активности СОД и глутатионпероксидазы, активности α_2 -макроглобулина в крови собак, но только в течение первых 10 суток. Затем пул Fe^{3+} -ТФ уменьшался и к 90-м суткам составлял 50% от исходного значения. Эти наблюдения подтверждают развитие адаптивных реакций в условиях γ -облучения малыми дозами и позволяют сделать вывод о динамическом регуляторном организменном SOS-ответе, отражающем единый характер процессов клеточного обновления кроветворной ткани [25].

Анализ динамики величин ЭПР-показателей свидетельствует о колебательном характере биохимической адаптации к пролонгированному радиационному фону и позволяет судить о закономерных реакциях, отражающих феномены цитогенетической индивидуальной радиорезистентности организма. Несомненно, что ЭПР-биомаркеры определяют фенотипические реакции, реально связанные с дозой облучения, вплоть до низких доз. Установлено, что накопление даже малой дозы облучения млекопитающими приводит к уменьшению пула Fe^{3+} -ТФ, и это негативно отражается на процессах гемопоэза и эритропоэза, а также не может не сказаться на пролиферативной активности клеток.

Таким образом, на основе пострадиационных индивидуальных изменений пулов Fe^{3+} -ТФ в крови подопытных собак в стандартном неспецифическом ответе на γ -облучение можно выделить следующие стадии: 1) SOS-повышение пулов и активности фермента RR, результатом которого является активация синтеза dNTP и ДНК;

2) последующее, в течение первых суток, уменьшение пулов и ингибирование RR-активности, приводящее к подавлению железозависимых, в том числе митохондриальных энергетиче-

ских процессов, и синтеза dNTP, ДНК, РНК и белков;

3) восстановление RR-активности и ключевых процессов развития компенсаторно-восстановительных реакций организма связано с интегральным повышением мощности систем железозависимых синтезов dNTP, ДНК и всего белоксинтезирующего аппарата.

В течение первых суток после облучения, за счет выраженного ингибирующего эффекта RR и снижения синтеза предшественников ДНК (dNTP), усиливается первичное радиационно-индуцированное поражение – критическое для развития и дальнейших возможных повреждений ДНК. Вторая волна – активация синтезов – обеспечивает развитие компенсаторно-восстановительных реакций клеточных систем органов и тканей, направленных на репарацию клеточных структур и соответствующих адекватных, обеспечивающих защиту организма метаболических реакций. Важно отметить, что установлена зависимость этих репарационных SOS-ответов от исходного состояния организма и его индивидуальной радиочувствительности.

Анализ количественных показателей и их причинная обусловленность в условиях РОС позволяют заключить об инициации резервных возможностей организменного SOS-ответа важнейших систем жизнеобеспечения. Установлены функциональная роль и возможность использовать в качестве биомаркеров плазменные белки крови Fe^{3+} -трансферрина (Fe^{3+} -ТФ) и Cu^{2+} -церулоплазмина (Cu^{2+} -ЦП), участвующие в метаболическом контроле синтезов dNTP и изменении режима функционирования систем синтеза ДНК, РНК и белков в условиях действия экопатогенных факторов. Эффективное использование ЭПР-методологии позволяет характеризовать ранние молекулярно-клеточные SOS-реакции и комплексную оценку совокупности параметров, обеспечивающих каскад системных защитных реакций организма в условиях облучения. Обнаруженные в радиобиологических экспериментах закономерности подтверждают, что в тканях и органах главной мишенью радиационного поражения служит система биосинтеза макромолекул ДНК, РНК и белков. Дисбалансная концепция мутагенеза расширила наше понимание круга явлений SOS-адаптации, позволила по-новому объяснить стохастический характер возникновения фенотипических мутаций и прийти к заключению, что “мутагенная репарация управляется сложными эволюционно наработанными механизмами регуляции и не оставляет сомнений относительно физико-химической природы этого процесса [23].

СТРЕСС-АДАПТИВНОСТЬ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ SOS-РЕПАРАЦИИ ФЕНОТИПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ОРГАНИЗМ

Сложные функциональные взаимоотношения между центральными регулирующими системами (нервная, иммунная, эндокринная, репродуктивная) и субклеточными энзиматическими системами (антиоксидантная и ДНК-репарирующая) в экстремальных условиях могут нарушаться, увеличивать радиационно-индуцированную нестабильность генома, повышать эндогенный мутагенный фон и перестраивать функциональное метаболическое состояние клеток, заметно изменяя их восприимчивость к стресс-фактору. Становится очевидным, что репарация ДНК имеет исключительное значение для поддержания надежности и устойчивости биологических систем при экстремальных воздействиях на организм.

Результаты исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют, что стресс адаптивный SOS-ответ при воздействии различной мощности и дозы ИИ в значительной степени зависит от генетических систем и подсистем клетки и организма. При выяснении физико-химических механизмов радиогенных повреждений существенным моментом для этой оценки служили вышеприведенные факты и феноменология дисбалансного мутагенеза и их роль в возникновении мутабельности и нарушения условий синтеза и репарации ДНК [17, 25].

Регистрация ЭПР-показателей и комплекса физико-биохимических характеристик указала на возможность оценить количественно жизненно важные цитогенетические эффекты радиационного поражения организма животных и человека. Эмпирическое обобщение фактического материала позволило выявить важную роль активности SOS-каскада механизмов репарации ДНК у млекопитающих в условиях общего облучения. И на этом основании предполагается комплексно отслеживать регулярное поведение и оценку отдаленных последствий мутагенных эффектов, обуславливающих нарушение эффективности SOS-репарации при перестройке режимов центральных функциональных систем организма [18, 25].

Описываемый подход становится расширенной методологической задачей: установить важную конкретику изменения широкого спектра молекулярно-клеточных диагностических параметров с участием центральных организменных систем регуляции метаболизма. Очевидно, предстоит изучать причинно-следственную взаимосвязь и взаимозависимость спектра реакций систем субклеточного метаболизма (энергетической, белоксинтезирующей, генетической, детоксици-

рующей) в условиях моделирования различных режимов угнетающего или стимулирующего действия процессов облучения.

Физико-химические закономерности, в экстремальных условиях существования, насколько мы проверили в экспериментах с помощью ЭПР-показателей, имеют универсальное значение при изучении сложных биологических систем и во многом определяют перспективы теоретических обобщений и практических предложений. При более глубоком анализе SOS-реакций крупных организмов (и особенно человека) необходимо рассматривать их в сопоставлении со специальными цитогенетическими фактами, отражающими дополнительный аспект описания и интерпретации системных радиогенных изменений в организме.

Стохастический характер изучаемых процессов и индивидуальные различия в чувствительности организма к действию ИИ имеют решающее значение как в биологической статистичности, так и в проявлении неопределенностей изучаемых эффектов. Простое измерение генетического “брутто”-эффекта, пусть даже и дополненное биофизическим анализом молекулярно-клеточных реакций, не обеспечит установление надежного “порога” действия ИИ и вывода о роли критических фенотипических мутаций в возникновении конкретной экопатологии. Решающее значение имеет возможность судить по динамическому характеру комплексного организменного SOS-ответа о вероятности перехода изучаемых биологических систем в экстремальных условиях из одного состояния в другое [25].

Формирование идеологии и выработку концепции мы начинали с изучения последствий высоких доз γ -облучения, снижая их в опытах на животных до реально малых доз. При изучении закономерностей реакций генетических систем и подсистем клетки важно было зарегистрировать комплекс показателей раннего интегрального SOS-ответа. Было показано, что темп и характер возникающего SOS-каскада неспецифической адаптивной активности определяют стартовые точки и количественные реакции систем, чувствительных к отдаленным негативным последствиям, реально связанным с нарушениями эффективности репарационных процессов в системе ДНК кроветворных органов [26]. С этим связано выявление фактов о накоплении мутаций в митохондриальном геноме, где скорость мутаций существенно выше, чем в ядерном. Речь идет о возникновении специальных режимов индукции дополнительных репарирующих систем к широкому спектру возмущений от экопатогенных агентов различной природы и вероятному возникновению злокачественных радиогенных опухолей и лейкозов в облученном организме

[27]. Количественная интерпретация и возможность функциональной оценки стохастических звеньев и их системного характера с помощью комплекса цитогенетических критериев SOS-реакций чрезвычайно важны именно в связи с прогностическим анализом возникновения отдаленных последствий в условиях индивидуального организма. Безусловным моментом в реальной оценке индивидуальной радиоустойчивости служит выявление конкретных информационных различий в SOS-ответах с учетом дополнительных факторов внешней среды. Использование эпигенетических механизмов реально определяет итоговые фенотипические реакции млекопитающих на облучение. В этих условиях необходимы оценка (по совокупности параметров) устойчивости организма к общему γ -облучению и вычленение из общих взаимосвязанных изменений главных звеньев ведущих механизмов, обуславливающих определенные негативные радиобиологические эффекты.

Мониторинг состояния здоровья детей, подвергшихся радиационному воздействию в малых дозах, имеет новое и самостоятельное значение также как и установление индивидуальной повышенной радиационной чувствительности в детской популяции с помощью тестов молекулярного и клеточного уровня [28–30]. Первичная реакция детского организма к изменившемуся фону на начальном этапе заключается в повышении уровня Fe^{3+} -трансферрина и Cu^{2+} -церулоплазмينا в крови и плазме, что функционально связано с активацией окислительных и энергетических реакций, обеспечивающих адекватный контроль за скоростью-лимитирующей стадией в синтезе ДНК. При проведении длительного динамического обследования было зарегистрировано сохранение закономерного повышенного уровня содержания Fe^{3+} -трансферрина и Cu^{2+} -церулоплазмينا в крови и плазме у детей, что обеспечивает активацию синтеза dNTP и ДНК, т.е. защиту и восстановление кроветворной и репродуктивной систем организма в ответ на длительное радиационное воздействие. У детей, проживающих в регионах с более высоким уровнем загрязнения радионуклидами, установлено устойчивое снижение интенсивности сигналов Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП в крови и плазме при сохранении динамики фазовозависимых изменений клеточного метаболизма у облученных. Это свидетельствует о снижении включения ионов железа в апотрансферрин, ухудшении антиоксидантных свойств крови, подавлении синтеза dNTP из-за ингибирования свободнорадикальной активности RR. Последнее привело к подавлению синтеза dNTP, следовательно, — ингибированию скорость-лимитирующей стадии в синтезе ДНК, а также к ингибированию синтеза железосодержащих белков и ферментов. Нарушение работы ЦЭТ приводит к

усилению продукции активных форм кислорода и развитию хронического и острого энергетического кризиса, возникающего на уровне целого организма [27, 31].

На фоне изменчивости уровня мутагенеза установлены сведения об увеличении выхода мутаций митохондриальной ДНК по сравнению со спонтанным уровнем этих нарушений. Существуют многочисленные свидетельства того, что окислительный стресс и мутации мтДНК снижают митохондриальный синтез АТР [27, 33]. Таким образом, возникает хорошо известная ситуация “порочного круга”, когда снижение синтеза АТР под влиянием указанных факторов приводит к снижению активности RR, нарушению баланса dNTP, что чревато снижением эффективности репарации и повышением мутаций в мтДНК, которые, в свою очередь, вызывают дальнейшее снижение синтеза АТР и т.д. Это позволяет считать уровень активности RR, зависящей от концентрации АТР, важным непосредственным фактором высокой частоты мутаций мтДНК [34, 35]. Интерпретация результатов позволила заключить, что комплекс ЭПР-биомаркеров радиочувствительности отражает совокупные возможности оценить пороговые и дозовые эффекты, выявить детерминанты адаптивных молекулярных реакций облученного организма детей в критические периоды их роста. Повышенная индуцированная нестабильность генома, мутации в соматических клетках, снижение эффективности репарации увеличивают риск развития молекулярно-геномных повреждений и увеличивают состояние дезадаптации детского организма [35, 36].

Цитогенетические исследования показали увеличение частоты aberrаций хромосом, активацию соматического мутагенеза, накопление клеток с дисгеномными эффектами в детском организме [30]. По структуре хромосомных aberrаций выявлено увеличение количества делеций, инверсий, колец, изохроматидных и одиночных фрагментов и пробелов, полиплоидии. У детей, проживающих в регионах радионуклидного загрязнения, уровень внеклеточной ДНК (вкДНК) статистически значимо превышает таковой показатель в группе сравнения. Установлено, что в группе детей, облученных внутриутробно и рожденных в 1986–1987 гг. (1-е поколение), имеет место значительное повышение вкДНК (7.87 ± 0.58 мкг/мл) а в группе сравнения – 4.53 ± 0.23 . Повышенный уровень вкДНК и увеличение выхода в циркуляцию клеток – предикторов апоптоза (клетки с иммунофенотипом CD95+) характеризуют активность клеточного апоптоза и могут свидетельствовать о наличии склонности к новообразованиям [29, 30]. Отметим, что у детей из регионов радионуклидного загрязнения дисгеномные эффекты сопровождаются закономерным параллелизмом явле-

ний нарушения нуклеотидного обмена: изменения соотношений уровня нуклеотидов и их метаболитов в крови регистрируются чаще, чем в группе сравнения [32].

Все это указывает на регуляторное непостоянство генома, активную элиминацию “поломок” ДНК, высокую скорость процессов катаболизма, т.е. развитие фенотоза. Это связано с комплексной модификацией генной экспрессии, обуславливающей как потенциально обратимые изменения, так и возможное развитие экопатологии. Однако “вклад генома” можно по-настоящему оценить только в контексте взаимодействия организма со средой обитания (эпигеномика в действии).

Существует необходимость в продолжении исследований. И на этом пути могут быть получены результаты для выявления групп повышенного риска на основе изучения молекулярно-клеточных механизмов и использования новых дополнительных научных критериев оценки последствий, приводящих “по факту” к пролиферативным заболеваниям и опухолевому росту. Дальнейшее посемейное изучение индивидуальных генотипических особенностей детских организмов, использование методов аналитического и математического анализа, выявление адекватных индивидуальных оценок наследуемости мультифакториальных заболеваний потребует серьезного компьютерного мониторинга. Это позволит определить неизвестные факты индуцибельной SOS-репарации и “несовершенств” репарации, приводящих к реализации адекватных мутагенных эффектов радиационного воздействия в растущем организме ребенка.

Принципиально важно установление предельно допустимых доз и мощностей облучения для выяснения концепции “пороговости” действия и сведений о влиянии хронического воздействия малых доз ионизирующих излучений. Это может способствовать выявлению групп людей с повышенным риском возникновения различных экопатологий. Научный интерес представляет анализ динамики комплекса показателей: совокупности общепринятых параметров радиочувствительности и количественные сведения об увеличении выхода конкретных видов спонтанных мутаций мтДНК и яДНК, о фактах экспрессии определенных генов в ядрах и митохондриях, об экзо/эндогенных факторах, обуславливающих нарушение регуляции эффективности SOS-репарации. Это может отражать интегральную устойчивость, зависящую от режимов “поведения” функциональных систем регуляции целостного организма.

Развитие методов анализа и прикладная направленность исследований стали убедительным “руководством к действию”: необходимость изучения механизмов эффективной радиозащи-

ты и модификации лучевого повреждения уникальных структур клетки на основе комплекса цитогенетических количественных показателей репарации повреждения ДНК. Целью является выяснение роли индуцированного мутагенеза и закономерностей возникающих фенотипических изменений при действии экофакторов различной природы на потенциал живых систем. Определяющее значение в экстремальных условиях существования приобретает анализ фактов и физико-химических механизмов радиационной опасности с учетом дополнительных экопатогенных воздействий. Все это связано с перспективами развития современной оценки непосредственных и отдаленных последствий радиоактивных загрязнений для людей и биоценозов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА dNTP И ДНК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ ОБЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

Анализ собственных результатов и научных идей, касающихся принципиально важной взаимосвязи фенотипических мутационных повреждений с формированием резистентности организма к ДНК-повреждающим агентам во многом определил методологические подходы к задачам противорадиационной защиты. Напомним, что существует биохимический путь регуляции свободнорадикальной активности RR, который в большей степени нарушается при воздействии радиации и в пострadiационном периоде. Для фермента RR биохимическими регуляторами активности являются редокс-состояние SH-групп в активном центре, пулы АТФ и dNTP, концентрация внутриклеточного кислорода и ионов железа, содержание восстановителей. Инициированные радиацией процессы пироксидного окисления негативно влияют именно на эти факторы, а участие повышенной активности RR помогает снижать летальный удар γ -облучения на синтез и репарацию ДНК. Отметим, что dNTP являются субстратами для ДНК-полимеразы, и ее активность регулируется по субстрат-зависимому механизму, что, безусловно, влияет на скорость синтеза ДНК.

В ряде наших работ были получены сведения, что существует дозозависимая корреляция между степенью ингибирования активности RR и накоплением разрывов в ДНК в УФ-облученной культуре фибробластов человека и других культурах клеток. Повышение активности RR или сохранение ее на уровне нормы обеспечивает пулы dNTP, достаточные для эффективной эксцизионной репарации ДНК. Так называемые “нерепарируемые” повреждения ДНК, составляющие 1–3% от общего количества, одно- и двунитевых разрывов ДНК, регистрировались спустя 6 ч после об-

лучения, когда активность RR была максимально снижена, но стоило добавить dNTP на фоне подавленной активности RR – происходила полная репарация разрывов ДНК уже в течение 1.5 ч [7, 15]. Как показано в этих работах, пострadiационное появление структурных дефектов ДНК, в определенной степени, обусловлено дефицитом и дисбалансом пулов dNTP, которые мобильно осуществляют и определяют неполноценную репликацию и дефектную репарацию.

Новый подход к созданию противолучевых средств различного назначения мы связываем с использованием концепции системного SOS-ответа молекулярно-генетических систем в условиях радиационного окислительного стресса. Роль дисбаланса дезоксирибонуклеотидов в генерации фенотипических мутационных повреждений ДНК и возникновении неспецифической адаптивной реакции клеточных систем на внешние воздействия достаточно очевидно. С этой точки зрения рассматриваем активацию определенных ферментных систем и экспрессию определенных генов, связанных с разного типа репарацией разрывов ДНК и/или накоплением летальных повреждений типа хромосомных aberrаций. Важно оценить регуляторный характер молекулярно-клеточной SOS-реакции в поддержании целостности генетических систем и подсистем клетки и попытаться установить критерии повышения резистентности организма в экстремальных условиях.

Примером использования результатов исследования стохастического характера возникновения фенотипических мутаций и взаимосвязанных хромосомных повреждений в условиях радиационно-окислительного стресса является попытка обосновать методологические аспекты ЭПР-анализа радиационных эффектов на основе механизмов, их определяющих. Исходя из расшифровки критических этапов и поиска критериев лучевого поражения на основе динамического SOS-ответа и с учетом закономерностей механизмов интерфазной гибели клеток, правильность нашей концепции была проверена на моделях радиозащиты с использованием радиопротекторов различного класса. В качестве маркеров радиочувствительности для оценки степени эффективности радиопротекторов использовали свободнорадикальную активность RR (в опытах на мышах) и изменения пулов Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП в крови и содержания $v_{нДНК}$ в плазме крови (в опытах на собаках). Изменения пулов позволяют надежно и количественно контролировать линейную зависимость дозовых реакций организменного ответа, степень радиационного поражения и результативность защитного действия перспективных радиопротекторов [15, 16].

Эффективные, по тесту выживаемости животных, радиопротекторы вызвали максимальное повышение RR-активности в сроки, когда у незащищенных облученных животных она была подавлена на 40–50% от контроля. Отметим, что у защищенных животных радиопротектор-обусловленное повышение RR-активности создавало условия для поддержания высоких сбалансированных пулов dNTP во время облучения. Это обеспечивает репликативный синтез ДНК и его эффективную репарацию в костном мозге и в селезенке от повреждений. При этом предотвращается образование новых радиационно-индуцированных повреждений ДНК и обеспечивается более раннее интенсивное развитие компенсаторно-восстановительных реакций. Исследования подтвердили, что радиопротекторы индралин и индометофен защищают синтез АТФ и гликогена в органах животных, повышают активность RR и обеспечивают индукцию синтеза dNTP в радиочувствительных органах [24].

Существование взаимосвязанных фактов и механизмов адекватного взаимодействия между активностью этого ключевого фермента ДНК-репарации и соответствующими изменениями пулов активных плазменных белков Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП в крови собак свидетельствуют о важной роли ферментной системы RR в эксцизионной репарации ДНК. Очевидно, что механизмы, обеспечивающие клеточную стабильность, закономерно осуществляют адекватную активацию синтеза дезоксирибонуклеотидов — субстратов ферментов синтеза ДНК [8–11]. Радиопротекторы, активируя синтез ДНК, РНК и белков, обеспечивают их защиту и полноценное восстановление в раннем пострadiационном периоде. Именно эти эффекты имеют решающее значение для поддержания жизнедеятельности клетки и определяют высокую выживаемость животных, облученных в смертельных дозах [14, 15]. По сути, дисбалансная концепция мутагенеза позволила подтвердить метаболическую природу мутагенного действия ионизирующих излучений и стохастический характер возникновения фенотипических мутаций и большого количества разнообразных хромосомных повреждений в условиях окислительного радиационного стресса. Экспериментально доказано, что активация синтеза dNTP к моменту облучения и в критические сроки лучевого поражения может быть реально использована в опытах радиозащиты организма с помощью радиопротекторов.

Именно на основе использования ЭПР-технологий удалось разработать рациональные унифицированные принципы отбора перспективных радиозащитных средств широкого назначения, обосновать дозы препаратов, установить режимы их введения для получения оптимальной защиты

по тесту выживаемости животных и развитию восстановительных процессов в крови и органах [14–18]. Предложена схема радиозащиты при остром облучении, в которой на этапе I используется модификатор радиорезистентности индометофен, повышающий на протяжении нескольких часов общую неспецифическую резистентность в группе животных. На этапе II используется радиопротектор экстренного действия — адренометик индралин. Установленный противолучевой эффект достигался введением половинной радиозащитной дозы препарата индралин, что, несомненно, уменьшало токсические эффекты и накопление продуктов деградации ДНК в условиях острого облучения [24, 25].

В опытах на собаках доказано, что индукторами синтеза dNTP могут быть вещества, являющиеся β -блокаторами адреналиновых рецепторов, а также вещества, обладающие эстрогеноподобным действием. Вещества, известные как антиоксиданты, также вызывают индукцию синтезов дезоксирибонуклеотидов, способствуют эффективной репарации ДНК и содействуют развитию метаболического радиоадаптивного ответа организма при нарушениях дыхательной цепи митохондрий. Использование ЭПР-биомаркеров позволило впервые обнаружить активацию синтезов дезоксирибонуклеотидов, ДНК, РНК и белков в органах при введении животным лекарственных веществ с антирадикальными свойствами (ионол и α -токоферол). Установлено, что эта активация является обязательной стадией в механизме протекторного действия этих веществ [26]. Приоритетными являются и данные, позволяющие выявлять и анализировать по динамике пулов плазменных белков Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП периферической крови изменение резистентности организма крупных животных и человека, что необходимо при проведении клинических испытаний препаратов. Эти тесты использовались нами для выявления метаболических изменений у лиц, работающих на радиационно опасных объектах, и у населения, в том числе у детей от облученных родителей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях [28–30, 32]. Впервые нами были разработаны и апробированы критерии отбора и формирования групп лиц с повышенной исходной индивидуальной резистентностью для проведения работ в условиях радиационного и химического риска. Несомненно, методы анализа индивидуальной чувствительности к воздействию γ -радиации еще требуют продолжения поиска, многое из феноменологического описания следует рассматривать как начало нового объекта дальнейших актуальных исследований [31].

В ходе биофизических исследований постепенно решается задача поисков ЭПР-маркеров периферической крови, позволяющих судить об изменении индивидуальной радиорезистентно-

сти организма. Это открывает практические перспективы целенаправленного выбора физиологически активных соединений, повышающих устойчивость организма к действию ДНК-тропных агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате аналитического обобщения фактического материала и выводов об индуцированном облучением мутагенезе как причине начала метаболическо-физиологических реакций сложились представления о вероятностном характере возникновения спектра повреждений важнейших систем жизнеобеспечения. В условиях повышенного уровня непостоянства генома, возрастания частоты мутаций в соматических клетках можно прогнозировать возникновение отдаленных эффектов ионизирующих излучений и в последующих поколениях облученных клеток. В междисциплинарном исследовании ЭПР-технологии позволили обосновать, в рамках нашей задачи, биодозиметрические подходы на основе анализа закономерностей развития SOS-реакции клеток тканей и органов в ответ на γ -облучение.

Фундаментальные исследования *in vitro* и на организменном уровне выявили сложный и нетривиальный характер молекулярно-клеточного SOS-ответа системы репарационного синтеза ДНК, обеспечивающего раннее и интенсивное развитие типичного радиоадаптивного ответа организма. Анализ физико-химических механизмов и количественное обоснование специализированных ЭПР-баз данных из радиобиологических опытов позволили выработать систему взглядов на природу организменного SOS-ответа на повреждающие воздействия. Эксперименты показали, что существует взаимосвязь и взаимозависимость фенотипических молекулярно-клеточных характеристик, обеспечивающих и сохраняющих стохастический результат жизнеобеспечения.

На новом этапе накопления фактов открываются перспективы изучения природы и количественных интерпретаций физико-химических механизмов репарации лучевых повреждений, возможности их модификации и повышения жизнеспособности облученного организма. Несомненно, свободнорадикальный фермент RR активно участвует в клеточном SOS-ответе системы *de novo* синтеза dNTP и играет ключевую роль в реакциях систем репликации и репарации ДНК, РНК и белков на действие γ -радиации. Экспериментально подтверждено, что дисбаланс скоростей синтеза ДНК и белка, как и дисбаланс нуклеотидов, усугубляют ошибки репликации и репарации ДНК. Именно объективным результатом SOS-ответов и, в том числе, последствиями дисбаланса пулов нуклеотидов являются факты возрастания частоты генных мутаций и мутаций хро-

мосом при действии экопатогенных факторов. Существенно, что по величине SOS-ответа и последующей динамике адаптивных молекулярно-клеточных реакций можно судить о силе действующих стресс-агентов различной природы и, применяя модификаторы и протекторы, влиять на SOS-реакцию. Удовлетворительным результатом экспериментов является вывод: пулы Fe^{3+} -ТФ и Cu^{2+} -ЦП в периферической крови могут быть использованы в качестве высокочувствительных маркеров действия генотоксических агентов.

Биофизический подход к анализу фактов о природе фенотипических радиогенных повреждений дает возможность судить о характере и степени возникающих физиологических изменений в индивидуальном облученном организме. Удастся тестировать развитие процессов во времени в зависимости от исходного состояния организма и осуществлять количественный контроль молекулярно-клеточных результатов радиационных воздействий. Фазные изменения определяемых ЭПР-показателей их сопоставление и качественное соответствие с цитогенетическими характеристиками способствуют прогностическому пониманию и оценке стохастически возникающих радиогенных повреждений метаболизма, достигающих уровня необратимых, в условиях использования высоких доз γ -облучения. Можно предполагать, что в условиях влияния разнообразных экопатогенных факторов среды обитания живых систем существует базисный универсальный механизм SOS-ответа, сформировавшийся как "высшая реальность" у млекопитающих в результате эволюционного развития.

Согласно развиваемой концепции, именно мобилизацией природного компенсаторного цитогенетического механизма может быть обусловлена репарация лучевых повреждений и, в том числе, закономерное увеличение вероятности мутаций в условиях γ -облучения. Предлагаемая концепция требует дальнейшего анализа и конкретного наполнения динамического SOS-ответа количественными оценками внутриклеточных сдвигов энергетического метаболизма, классификации "качества" процессов репаративного синтеза ДНК, новыми молекулярными критериями радиационных повреждений (системными по значению) и совокупных характеристик индивидуальных реакций фенотипа в экстремальных условиях. Это означает, что на первое место выходит признание важности и необходимости фундаментальных идей и, в том числе, изучения фактов и понимания критериев эпигенетических изменений в системе наследственности в условиях внешней среды.

Результаты аналитического обзора убеждают в необходимости современного изучения и понимания фундаментальных механизмов клеточного гомеостаза, обеспечивающего стабильность жи-

вых систем в условиях загрязнения биосферы. Упреждающий эффект мутаций с выраженными фенотипическими проявлениями, обеспечивающий защитный потенциал, может заключаться в активации процессов репарации в митохондриальной RR и способствовать выживанию организма без существенных повреждений генома. Аппарат SOS-репарации и мутагенеза в организме под воздействием радиации в малых дозах может содействовать привлечению стресс-индуцированных репарационных ферментов к поврежденным участкам ДНК и временно поднять частоту мутаций именно в генах репарации [27, 31, 37].

Использование современного эмпирического знания недостаточно для понимания сути сложного защитного явления в его реальной природной самонастраивающейся биологической завершенности. Однако, на основе исследовательских фактов об эффектах целого ряда радиомодифицирующих соединений, была установлена возможность расширить перспективы поиска новых антиканцерогенных, антирадикальных, антиоксидантных и противолучевых средств в биомедицинских экспериментах и в клинике. Результаты работы могут оказаться необходимыми для будущего достижения цели познать роль SOS-репарационных реакций повреждений ДНК, обеспечивающих вероятностный характер выживания индивидуальных млекопитающих в экстремальных для организма условиях [38, 39].

Метод ЭПР оказался абсолютно необходим в междисциплинарном комплексе для научного рассмотрения и адекватной оценки возможностей и причин возникновения генных мутаций из-за дисбаланса пулов dNTP в тканях кровеносных органов в условиях острого облучения в опытах на крупных млекопитающих (собаки) и мониторинга разновозрастных когорт детского населения из регионов радионуклидного загрязнения. Неоднозначность анализа интегральных процессов и интерпретаций их механизмов, тем не менее, имеют смысл как попытка судить о феномене радиорезистентности организма и стратегии его выживания в условиях не только радиационного фона Земли, но и околоземного пространства.

Для ретроспективной биодозиметрии все большее значение приобретает возможность количественного мультикомпонентного анализа повреждений ДНК и продуктов ее деградации; нарушение нуклеотидного обмена и систем репарации мтДНК; комплексная оценка экспрессии отдельных конкретных генов; регистрация метилирования ДНК и индукции микроРНК; оценка совокупности параметров, характеризующих антиоксидантный статус организма, и степени дестабилизации иммунной системы; наличие закономерного функционального сдвига к апоптозу у

поврежденных клеток. Очевидно, что это и есть будущие системные эмпирические факты, позволяющие выстраивать определенную цепочку логических заключений, отражающих влияние условий окружающей среды, запускающих мутагенез и обеспечивающих адаптацию к факторам стресса.

Эмпирическое обобщение дает основание предположить существование “высшей реальности” – базисного универсального адаптивного защитного SOS-ответа на экстремальные экопатогенные факторы, сформировавшегося в результате эволюционной парадигмы сложной системы живой жизни. Необходимость использовать механизм целенаправленного выживания на основе собственного гомеостаза определяет для организма жесткий выбор: среди множества критериев его жизнеобеспечения следует ограничиться рамками экологического императива. Для организма стратегическим приоритетом является выбор эффективных режимов системной регуляции и адекватного уровня управления репликацией и репарацией ДНК. В рамках этого понимания предстоит выяснить функциональную взаимосвязь возникающей мутационной нагрузки и адекватного репарационного SOS-ответа, обеспечивающего повышение резистентности и жизнеспособности организма в условиях экстремальной экопатогенной нагрузки. Результаты работы свидетельствуют о необходимости научного и практического контроля биофизико-генетических механизмов для анализа и понимания сути фенотипических молекулярно-клеточных характеристик и, в том числе, интерпретации и возможного повышения эффективности индуцированных SOS-реакций систем репарации ДНК в условиях действия экофакторов различной природы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания № 48.19, тема 0082-2019-0015 “Изучение принципов структурно-функциональной организации биомолекулярных систем, разработка методов дизайна их физико-химических аналогов и создание на этой основе биологически активных препаратов нового поколения”, № АААА-А20-120031490003-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thelander L., Reichard P.* Reduction of ribonucleotides // *Annu. Rev. Biochem.* 1979. V. 48. P. 133.
2. *Pulatova M.K., Sharygin V.L., Filatov D.E., Todorov I.N.* ESR studies of the role of ribonucleotide reductase in DNA synthesis regulation during normal and pathological processes in animal tissues // *Highlights of Modern Biochemistry* / Eds A. Kotyk, I. Skoda, V. Paces, V. Kostka. Zeist: VSP Int. Sci. Publishers, 1989. P. 215–229.

3. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Филатов Д.Э., Тодоров И.Н. Активация рибонуклеотидредуктазы как показатель SOS-реакции на воздействие экстремальных факторов, повреждающий ДНК в клетках высших животных // Докл. РАН. 1995. Т. 340. № 1. С. 123–127. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Filatov D.E., Todorov I.N. Aktivacija ribonukleotidreduktazy kak pokazatel' SOS-reakcii na vozdejstvie jekstremal'nyh faktorov, povrezhdajushhij DNK v kletkah vysshih zhivotnyh // Dokl. RAN. 1995. V. 340. № 1. P. 123–127. (In Russian)]
4. Pulatova M.K., Sharygin V.L. Free radical reactions in mechanisms of damage, repair and protection of blood systems // Free Radicals in Biology and Environment. Ser. A. Life Science / Ed. F. Minisci. V. 27. Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 305–315.
5. Pulatova M.K., Sharygin V.L., Todorov I.N. The activation of ribonucleotide reductase in animal organs as the cellular response against the treatment with DNA damaging factors and the influence of radioprotectors on this effect // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1453. № 3. P. 321–329.
6. Балева Л.С., Сипягина А.Е., Смотряева М.А. и др. Маркеры метаболических изменений, возникающих вследствие воздействия ионизирующей радиации // Изв. РАН. Сер. Биол. 1995. № 6. С. 657–668. [Baleva L.S., Sipjagina A.E., Smotrjaeva M.A. et al. Markjory metabolicheskikh izmenenij, vznikajushhijh vsledstvie vozdejstvija ionizirujushhej radiacii // Izv. RAN. Ser. Biol. 1995. № 6. P. 657–668. (In Russian)]
7. Baleva L.S., Pulatova M.K., Vartanyan L.S. et al. The Assessment of Biochemical Changes in the Blood of Children Exposed to Radiation at Low Dose Rate after the Chernobyl Atomic Power Station Accident // Phys. Chem. Biol. Med. 1995. V. 2. P. 115–126.
8. Snyder R.D. The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA excision repair and replication in human cells by hydroxyurea // Mutat. Res. 1984. V. 131. № 3–4. P. 163.
9. Cory J.G., Carter G.L. Drug action on ribonucleotide reductase // Advances in Enzyme Regulation / Ed. G.N.Y. Werber. L.: Pergamon Press, 1986. V. 24. P. 385–401.
10. Elledge S.J. and Davis R.W. DNA damage induction of ribonucleotide reductase // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. № 11. P. 4932.
11. Genetic Consequences of Nucleotide Poolimbalance / Ed. F.S. De Serres. N.Y.: Plenum Press, 1985. 512 p.
12. Meuth M. The molecular basis of mutations induced by deoxynucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells // Experim. Cell. Res. 1989. V. 181. № 2. P. 305–316.
13. Nordlund P. and Reichard P. Ribonucleotides Reductases // Annu. Rev. Biochem. 2006. V. 75. P. 681–706.
14. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г., Тодоров И.Н. Временные и дозозависимые пострадиационные изменения в содержании Fe³⁺-трансферина и Cu²⁺-церулоплазмينا в крови животных и их влияние на RR-активность тканей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 6. С. 662–667. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G., Todorov I.N. Vremennye i dozozavisimye postradiacionnye izmenenija v sodержanii Fe³⁺-transferrina i Cu²⁺-ceruloplazmina v krvi zhivotnyh i ih vlijanie na RR-aktivnost' tkanej // Radiac. biologija. Radioekologija. 2003. V. 43. № 6. P. 662–667. (In Russian)]
15. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Шлякова Т.Г. Реакции системы синтеза дезоксирибонуклеотидов на облучение и их модификация радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 1. С. 29–43. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Shljakova T.G. Reakcii sistemy sinteza dezoksiribonukleotidov na obluchenie i ih modifikacija radioprotektorami // Radiac. biologija. Radioekologija. 2003. V. 43. № 1. P. 29–43. (In Russian)]
16. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г. и др. Активация радиопротекторами и антиоксидантами синтеза дезоксирибонуклеотидов как важнейшая стадия в механизме формирования резистентности организма к действию ДНК-повреждающих факторов // Изв. РАН. Сер. Биол. 2005. № 4. С. 401–422. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G. et al. Aktivacija radioprotektorami i antioksidantami sinteza dezoksiribonukleotidov kak vazhnejshaja stadija v mehanizme formirovanija rezistentnosti organizma k dejstvuju DNK-povrezhdajushhijh faktorov // Izv. RAN. Ser. Biol. 2005. № 4. P. 401–422. (In Russian)]
17. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г. и др. Радиоспектроскопия ЭПР как метод регистрации изменения радиорезистентности организма. Экспериментальное обоснование // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 2. С. 311–322. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G. et al. Radiospektroskopija JePR kak metod registracii izmenenija radiorezistentnosti organizma. Jeksperimental'noe obosnovanie // Biofizika. 2009. V. 54. Vyp. 2. P. 311–322. (In Russian)]
18. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Шлякова Т.Г. и др. Радиоспектроскопия ЭПР как метод регистрации изменения радиорезистентности организма. Клиническое обоснование // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 2. С. 323–333. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Shljakova T.G. et al. Radiospektroskopija JePR kak metod registracii izmenenija radiorezistentnosti organizma. Klinicheskoe obosnovanie // Biofizika. 2009. V. 54. Vyp. 2. P. 323–333. (In Russian)]
19. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куронтева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии / Ред. Л.Х. Эйбус. М.: Энергоатомиздат, 1989. 232 с. [Pulatova M.K., Rihireva G.T., Kuropteva Z.V. Elektronnyj paramagnitnyj resonans v moleculyarnoj radiobiologii / Red. L.H. Ejbus. M.: Energoatomizdat, 1989. 232 p. (In Russian)]
20. Thelender L. Ribonucleotide reductase and mitochondrial DNA synthesis // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 703–704.
21. Crichton R.R. Proteins of iron storage and transport // Adv. Protein. Chem. 1990. V. 40. P. 281.
22. de Jong G., van Dijk J.P., van Eijk H.G. The biology of transferrin // Clin. Chim. Acta. 1990. V. 190. № 1–2. P. 1.
23. Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции / Пер. с англ. М.: ЗАО Изд-во Центрполиграф, 2014. 527 с. [Kunin E.V. Logika sluchaja. O prirode i proishozhdenii biologicheskoj jevoljucii / Per. s angl. M.: ZAO Izdatel'stvo Centrpoligraf, 2014. 527 p. (In Russian)]

24. Шлякова Т.Г., Шарыгин В.Л., Зорин В.В., Чернов Г.А., Пулатова М.К. Влияние индометопена на противолучевые свойства индралина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 1. С. 50–56. [Shlyakova T.G., Sharygin V.L., Zorin V.V., Chernov G.A., Pulatova M.K. Vliyanie indometofena na protivoluchevye svojstva indralina // Radiacionnaja biologija. Radiojekoologija. 2014. V. 54. № 1. P. 50–56. (In Russian)]
25. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Сипягина А.Е., Балева Л.С. Использование магниторезонансной спектроскопии при системном анализе радиочувствительности / радиорезистентности животных и человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 2. С. 151–169. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Sipjagina A.E., Baleva L.S. Ispol'zovanie magnitorezonansnoj spektroskopii pri sistemnom analize radiochuvstvitel'nosti / radiorezistentnosti zhivotnyh i cheloveka // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2013. V. 53. № 2. P. 151–169. (In Russian)]
26. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К. ЭПР-спектроскопия при системном анализе радиорезистентности организма животных и человека. Чернобыльский аспект // Сб. трудов XXII ежегодной конф. ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, секция “Динамика химических и биологических процессов”. М.: РУДН, 2017. С. 71–81. [Sharygin V.L., Pulatova M.K. JePR-spektroskopija pri sistemnom analize radiorezistentnosti organizma zhivotnyh i cheloveka. Chernobyl'skij aspekt // Sb. trudov XXII ezhegodnoj konferencii IHF im. N.N. Semjonova RAN, sekcija “Dinamika himicheskikh i biologicheskikh processov”. M.: RUDN, 2017. S. 71–81. (In Russian)]
27. Тодоров И.Н. Роль оксидативного стресса и мутаций митохондриальной ДНК в процессе старения, прогрессии патологий и апоптоза // Рос. хим. журн. Менделеевского об-ва. 2007. Т. LI. № 1. С. 93–106. [Todorov I.N. Rol' oksidativnogo stressa i mutacij mitohondrial'noj DNK v processe starenija, progressii patologij i apoptoza // Ros. him. zhurn. Mendeleevskogo ob-va. 2007. V. LI. № 1. P. 93–106. (In Russian)]
28. Сипягина А.Е., Балева Л.С., Пулатова М.К., Шарыгин В.Л. и др. Организация медицинской помощи детям различных когорт наблюдения, подвергшимся воздействию малых доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 3. С. 374–380. [Sipjagina A.E., Baleva L.S., Pulatova M.K., Sharygin V.L. i dr. Organizacija medicinskoj pomoshhi detjam razlichnyh kogort nabljudenija, podvergshimsja vozdejstviju malyh doz radiacii // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2006. V. 46. № 3. P. 374–380. (In Russian)]
29. Сипягина А.Е., Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Сусков И.И. Критерии повышенной чувствительности к малым дозам ионизирующего излучения и ее значение в формировании адаптивных процессов у детей // Здоровье детей и радиация: Актуальные проблемы и решения / Под ред. Л.С. Балевой и А.Д. Царегородцева. Вып. 2. М., 2006. С. 149–160. [Sipjagina A.E., Pulatova M.K., Sharygin V.L., Suskov I.I. Kriterii povyshennoj chuvstvitel'nosti k malym dozam ionizirujushhego izlucheniya i ejo znachenie v formirovanii adaptivnyh processov u detej // Zdorov'e detej i radiacija: aktual'nye problemy i reshenija / Pod red. L.S. Balevoj i A.D. Caregorodceva. Вып. 2. М., 2006. С. 149–160. (In Russian)]
30. Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. и др. 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., Suskova V.S. et al. Problema inducirovannoj genomnoj nestabil'nosti kak osnovy povyshennoj zabolevaemosti u detej, podvergajushhhsja nizkointensivnomu vozdejstviju radiacii v malyh dozah // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2006. V. 46. № 2. P. 167–177. (In Russian)]
31. Шарыгин В.Л., Сипягина А.Е., Балева Л.С. и др. Опыт использования магниторезонансной спектроскопии при системном анализе радиочувствительности/радиорезистентности животных и человека // Динамика химических и биологических процессов, XXI век. М.: Книга по Требованию, 2012. С. 413–441. [Sharygin V.L., Sipjagina A.E., Baleva L.S. et al. Opyt ispol'zovanija magnitorezonansnoj spektroskopii pri sistemnom analize radiochuvstvitel'nosti/radiorezistentnosti zhivotnyh i cheloveka // Dinamika himicheskikh i biologicheskikh processov, XXI vek. M.: Kniga po Trebovaniju, 2012. P. 413–441. (In Russian)]
32. Сипягина А.Е., Балева Л.С., Карахан Н.М., Яблонская М.И., Шарыгин В.Л. Характеристика и роль изменения нуклеотидов в I–II поколениях детей, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017, 11–15 сентября 2017 г. / Под ред. Ю.А. Омельчук, Н.В. Ляминой, Г.В. Кучерик. Севастополь: СевГУ, 2017. С. 1229–1233. [Sipjagina A.E., Baleva L.S., Karahan N.M., Jablonskaja M.I., Sharygin V.L. Harakteristika i rol' izmenenija nukleotidov v I–II pokolenijah detej, prozhivajushhjih v zagrjaznennyh radionuklidami regionah // Jekologicheskaja, promyshlennaja i jenergeticheskaja bezopasnost' – 2017, 11–15 sentjabrja 2017 g. / Pod red. Ju.A. Omel'chuk, N.V. Ljaminov, G.V. Kucherik. Sevastopol': SevGU, 2017. P. 1229–1233. (In Russian)]
33. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ионизирующая радиация может активировать встраивание фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47. № 4. С. 673–683. [Gaziev A.I., Shajhaev G.O. Ionizirujushhaja radiacija mozhet aktivirovat' vstraivanie fragmentov mitohondrial'noj DNK v jadernyj genom // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2007. T. 47. № 4. P. 673–683. (In Russian)]
34. Газиев А.И. Пути сохранения целостности митохондриальной ДНК и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 2. С. 117–136. [Gaziev A.I. Puti sohraneniya celostnosti mitohondrial'noj DNK i funkcij mitohondrij v kletkah, podvergshihhsja vozdejstviju ionizirujushhej radiacii // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2013. V. 53. № 2. P. 117–136. (In Russian)]

35. *Тодоров И.Н., Тодоров Г.И.* Мультифакторная природа высокой частоты мутаций мтДНК соматических клеток млекопитающих // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 9. С. 1184–1194. [*Todorov I.N., Todorov G.I.* Mul'tifaktornaja priroda vysokoj chastoty mutacij mTDNK somaticheskikh kletok mlekopitajushhih // Biohimija. 2009. V. 74. Vyp. 9. P. 1184–1194. (In Russian)]
36. *Газиев А.И., Шайхаев Г.О.* Повреждение митохондриального генома и пути его сохранения // Генетика. 2008. Т. 44. № 4. С. 437–455. [*Gaziev A.I., Shajhaev G.O.* Povrezhdenie mitohondrial'nogo genoma i puti ego sohraneniya // Genetika. 2008. V. 44. № 4. P. 437–455. (In Russian)]
37. *Rampazzo C., Ferraro P., Reichard P.* Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 17–19.
38. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с. [*Hesin R.B.* Nepostojanstvo genoma. M.: Nauka, 1984. 472 s. (In Russian)]
39. *Свердлов Е.Д.* Взгляд на жизнь через окно генома. В 3 т. Т. 1: Очерки структурной молекулярной генетики. М.: Наука, 2009. [*Sverdlov E.D.* Vzglyad na zhizn' cherez okno genoma. V 3 t. T. 1: Ocherki strukturnoj molekularnoj genetiki. M.: Nauka, 2009. (In Russian)]

The Methodology of EPR Spectroscopy using in Analysis of Physical and Chemical Mechanisms of Radio-genetics Damages in Animal and Human Organisms

V. L. Sharygin^{a,*,##}

^a *N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[#] *E-mail: sharygin@chph.ras.ru*

^{##} *E-mail: sharygin2011@mail.ru*

The responses of deoxyribonucleotide (dNTP), DNA and protein synthesis systems in blood-forming organs of animals (dogs, mice), as well as the changes in Fe³⁺-transferrin (Fe³⁺-TF) and Cu²⁺-ceruloplasmin (Cu²⁺-CP) pools in blood due to γ -irradiation and administration of radioprotectors have been studied. It has been shown that changes in Fe³⁺-TF and Cu²⁺-CP pools in blood serve the indices of the changes of body radioresistance and are reliably controlled by the EPR technique. The important role in the mechanism of the antiradiation activity of indometophene and indralin belongs to the increased ribonucleotide reductase activity and induction of the ribonucleotide synthesis, which provides effective reparation of the damage to the DNA of the cells in radiosensitive tissues and organs as a result of administration of radioprotectors at the optimal protective doses before radiation exposure.

Keywords: γ -radiation, EPR method, DNA, proteins, deoxyribonucleotides, Fe³⁺-transferrin, Cu²⁺-ceruloplasmin, extracellular DNA, radioresistance of organism, radioprotectors

РАДИАЦИОННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

УДК [57 + 61]:616.12-008.331:57.087.1:613.648

РИСК ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В КОГОРТЕ РАБОТНИКОВ ПО “МАЯК”, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

© 2021 г. Т. В. Азизова^{1,*}, К. В. Брикс¹, М. В. Банникова¹, Е. С. Григорьева¹

¹ Южно-Уральский институт биофизики, Озёрск, Россия

*E-mail: clinic@subi.su

Поступила в редакцию 21.06.2020 г.

После доработки 08.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Дана оценка риска заболеваемости артериальной гипертензией (АГ, 401–404 коды МКБ-9 или I10–I13 коды МКБ-10) в когорте работников, подвергшихся хроническому облучению. Риск заболеваемости АГ изучен в когорте работников предприятия атомной промышленности производственного объединения (ПО) “Маяк” (22377 человек), подвергшихся хроническому внешнему воздействию γ -излучения и/или внутреннему облучению (α -частицы). Средняя суммарная поглощенная в печени доза внешнего облучения у мужчин составила 0.45 ± 0.65 Гр и у женщин – 0.37 ± 0.56 Гр, а средняя суммарная поглощенная в печени доза внутреннего облучения (α -частицы) – 0.23 ± 0.65 Гр и 0.44 ± 1.93 Гр соответственно. Анализ включал расчет избыточного относительного риска на единицу дозы (ИОР/Гр) с помощью Пуассоновской регрессии. Зависимость избыточного относительного риска (ИОР; ERR – Excess relative risk), т.е. относительный риск (ОР; RR – Relative risk) минус 1, от дозы внешнего или внутреннего облучения с поправкой на нерадиационные факторы (пол, достигнутый возраст, календарный период, статус курения, статус употребления алкоголя) имела вид линейного тренда. В изучаемой когорте работников на конец периода наблюдения верифицировано 8425 случаев АГ: 5745 (68.2%) у мужчин и 2680 (31.8%) у женщин. Установлена статистически значимая линейная зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего облучения; ИОР/Гр = 0.14 (95%-ный ДИ 0.09; 0.20). Не выявлено статистически значимой сопряженности заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внутреннего воздействия α -излучения; ИОР/Гр = –0.01 (95%-ный ДИ *n/a*; 0.05). Риск заболеваемости АГ в изучаемой когорте работников был выше такового в японской когорте лиц, выживших после атомной бомбардировки (AHS), но ниже, чем в когорте ликвидаторов последствий радиационной аварии на Чернобыльской атомной электростанции.

Ключевые слова: риск, заболеваемость, артериальная гипертензия, профессиональное хроническое облучение, когорта работников ПО “Маяк”

DOI: 10.31857/S0869803121020041

Болезни системы кровообращения (БСК, класс VII МКБ-9 или класс IX МКБ-10) являются основной причиной смертности населения в мире. Класс БСК включает в себя различные группы заболеваний: ревматические болезни; болезни, характеризующиеся повышенным артериальным давлением (артериальная гипертензия (АГ)); ишемическая болезнь сердца (ИБС); цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ); болезни артерий и др. [1]. В последние десятилетия появляется все больше доказательств связи облучения и смертности от БСК в целом, а также отдельных групп заболеваний (и смертности от них) [2–11]. Однако информация о заболеваемости АГ и смертности от нее весьма ограничена. При этом данные об этих рисках в когортах лиц, подвергшихся хро-

ническому облучению с низкой мощностью дозы, отсутствуют. Поэтому целью настоящего исследования была оценка риска заболеваемости АГ (401–404 коды МКБ-9 или I10–I13 коды МКБ-10) в когорте работников, подвергшихся профессиональному хроническому облучению с низкой мощностью дозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Изучаемая когорта

Настоящее исследование является ретроспективным когортным исследованием. Изучаемая когорта включала всех работников ПО “Маяк” (первого в России крупного предприятия атомной промышленности, расположенного на Юж-

ном Урале, вблизи г. Озёрск), нанятых на один из основных заводов (реакторы, радиохимический или плутониевый) в период 1948–1982 гг., независимо от пола, возраста, образования, национальной принадлежности, профессии, продолжительности работы и других характеристик (22377 работников).

Период наблюдения за когортой начинался от даты найма на один из основных заводов и продолжался до даты первого из следующих событий: даты установления диагноза АГ; даты смерти; 31 декабря 2013 г. для тех, кто был жив в это время; даты “последней медицинской информации” для работников с неизвестным жизненным статусом и мигрантов (работников, выехавших из г. Озёрск на другое постоянное место жительства).

Все работники изучаемой когорты проходили обязательные медицинские обследования, которые включали: осмотр врачей-специалистов (терапевт, невролог, хирург, дерматолог, офтальмолог, отоларинголог, эндокринолог и другие врачи по медицинским показаниям), общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимические анализы крови и другие исследования (флюорография или рентгенография, электрокардиография, спирометрия, ультразвуковые методы обследования и другие по медицинским показаниям). Медицинские осмотры проводились каждые 3 мес. в период 1948–1953 гг., каждые 6 мес. в период 1951–1960 гг., и затем ежегодно в течение всего периода наблюдения. Кроме того, каждые 5 лет работники ПО “Маяк” в обязательном порядке проходили медицинские обследования в условиях специализированного стационара. Артериальное давление измерялось во время описанных выше регулярных медицинских осмотров в положении сидя стандартным методом аускультации с использованием ртутного сфигмоманометра.

В табл. 1 представлена подробная характеристика изучаемой когорты. Преобладающее большинство (более 80%) работников приняты на предприятие в возрасте моложе 30 лет. На конец периода наблюдения большинство работников (58%) были в возрасте моложе 50 лет. Около половины работников изучаемой когорты (47%) работали на ПО “Маяк” более 10 лет.

Жизненный статус на конец периода наблюдения известен у 95% членов когорты; из них 62% умерли, а 38% живы. Средний возраст на момент смерти у мужчин составил 61.5 ± 13.6 (среднее \pm стандартное отклонение) лет, и у женщин — 70.5 ± 12.4 лет; а средний возраст живых на конец периода наблюдения — 68.5 ± 10.4 лет и 76.6 ± 9.8 лет соответственно.

Источником информации о заболеваниях служили архивные и текущие медицинские карты, истории болезни. При сборе информации о смерти были использованы протоколы патологоана-

томического исследования и акты судебно-медицинской экспертизы, медицинские свидетельства о смерти.

В настоящем исследовании АГ — это синдром повышения систолического артериального давления (САД) ≥ 140 мм рт.ст. и/или диастолического артериального давления (ДАД) ≥ 90 мм рт.ст. Случаи АГ у работников изучаемой когорты были идентифицированы на основе медико-дозиметрической базы данных “Клиника” [12]. Были проведены ретроспективная экспертиза и верификация всех идентифицированных случаев АГ, основываясь на критериях Европейского общества гипертонии (ESH) и Европейского общества кардиологов (ESC) [13]. Важно отметить, что из анализа заболеваемости были исключены случаи АГ, подтвержденные как вторичная АГ (405 код МКБ-9 или I15 код МКБ-10), поскольку они были вызваны конкретной и потенциально обратимой/или необратимой причиной повышения АД.

Дозиметрия

Работники основных заводов ПО “Маяк” подвергались хроническому облучению в результате профессиональной деятельности: работники реакторов — только внешнему облучению, а работники радиохимического и плутониевого заводов — сочетанному облучению, т.е. внешнему облучению и внутреннему облучению (α -частицы от инкорпорированного плутония). С первых дней деятельности ПО “Маяк” дозы внешнего облучения измерялись индивидуальными дозиметрами, а поглощенные в органах дозы были рассчитаны с использованием дозиметрических моделей [14]. Начиная с 1970-х годов проводили измерения α -активности излучающих радионуклидов в биосубстратах (в основном, в моче), а поглощенные в органах дозы внутреннего воздействия α -излучения рассчитывались на основе этих измерений с использованием биокинетических и дозиметрических моделей [15].

В настоящем исследовании использованы индивидуальные оценки доз внешнего и внутреннего облучения улучшенной дозиметрической системы работников ПО “Маяк”, разработанной в рамках российско-американского сотрудничества — “ДСРМ-2013” [15, 16]. Согласно “ДСРМ-2013” дозы внешнего облучения были доступны для всех членов изучаемой когорты, а дозы внутреннего облучения (α -частицы) лишь для 31.1% работников, у которых были измерения α -активности в биосубстратах (у 29.1% мужчин и у 37.1% женщин).

Статистический анализ

Настоящий анализ был ограничен периодом проживания в г. Озёрск, так как информация о

Таблица 1. Характеристика изучаемой когорты работников ПО “Маяк”
Table 1. Characteristics of the study Mayak PA worker cohort

Распределение работников в зависимости от возраста на момент найма						
Возраст на момент найма, лет	Мужчины		Женщины		Оба пола	
	число	%	число	%	число	%
<20	5854	36.33	895	16.38	6749	31.28
20–24	5502	34.14	1911	34.97	7413	34.35
25–29	2217	13.76	966	17.68	3183	14.75
30–34	1007	6.25	605	11.07	1612	7.47
35–39	748	4.64	590	10.80	1338	6.20
≥40	786	4.88	497	9.10	1283	5.95
Всего	16114	100.00	5464	100.00	21578	100.00

Распределение работников в зависимости от достигнутого возраста на конец периода наблюдения						
Возраст на момент выхода из исследования, лет	Мужчины		Женщины		Оба пола	
	число	%	число	%	число	%
<40	7553	46.87	1698	31.08	9251	42.87
40–49	2471	15.33	829	15.17	3300	15.29
50–59	2968	18.42	1174	21.49	4142	19.20
60–69	2110	13.09	1046	19.14	3156	14.63
≥70	1012	6.28	717	13.12	1729	8.01
Всего	16114	100.00	5464	100.00	21578	100.00

Распределение работников в зависимости от продолжительности работы						
Продолжительность работы, лет	Мужчины		Женщины		Оба пола	
	число	%	число	%	число	%
<1	1145	7.11	300	5.49	1445	6.70
1–10	7451	46.24	2483	45.44	9934	46.04
>10	7518	46.66	2681	49.07	10199	47.27
Всего	16114	100.00	5464	100.00	21578	100.00

Распределение работников с АГ в зависимости от пола и достигнутого возраста на дату впервые установленного диагноза						
Достигнутый возраст, лет	Мужчины		Женщины		Оба пола	
	число	%	число	%	число	%
<40	1579	27.49	241	9.00	1820	21.60
40–49	1434	24.96	565	21.08	1999	23.73
50–59	1356	23.60	763	28.47	2119	25.15
60–69	1002	17.44	739	27.57	1741	20.67
≥70	374	6.51	372	13.88	746	8.85
Всего	5745	100.00	2680	100.00	8425	100.00

заболеваниях и нерадиационных факторах риска для мигрантов после выезда их из города на другое постоянное место жительства была недоступна.

Сравнение проводилось внутри изучаемой когорты работников ПО “Маяк”.

Основной анализ риска включал расчет относительных рисков (ОР; RR – relative risk) для отдельных категорий лиц с суммарной поглощенной дозой внешнего γ -излучения в печени (<0.10; 0.10–0.20; 0.20–0.50; 0.50–0.75; 0.75–1.00; 1.00–

1.25; 1.25–1.50; 1.50–2.00; 2.00–3.00; 3.00–4.00, ≥ 4.00 Гр) и суммарной поглощенной дозы внутреннего α -излучения в печени (<0.01 ; $0.01–0.025$; $0.025–0.05$; $0.05–0.10$; $0.10–0.15$; $0.15–0.25$; $0.25–0.50$; $0.50–1.00$; ≥ 1.00 Гр) относительно референс-категории (<0.10 Гр и <0.01 Гр соответственно).

Кроме того, были описаны модели доза–эффект для оценки линейного тренда показателей заболеваемости АГ от внешнего и внутреннего облучения. С помощью этих анализов были получены оценки избыточного относительного риска (ИОР; ERR – Excess relative risk) на единицу дозы (Гр).

Оценки ОР и ИОР/Гр рассчитывались с помощью Пуассоновской регрессии с использованием модуля AMFIT программы EPICURE [17]. 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) и статистическая значимость (значения p) были рассчитаны с помощью методов максимального правдоподобия. Все критерии статистической значимости были двусторонними. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Анализ зависимости АГ от дозы внутреннего облучения был ограничен работниками, для которых проводился мониторинг α -активности.

Как в анализах ОР, так и ИОР поправка с помощью стратификации была сделана на следующие факторы: пол, достигнутый возраст (<20 , $20–25$, ..., $80–85$, >85), календарный период (1948–1950, 1951–1955, 1956–1960, ..., 2011–2013), статус курения (никогда не курил, когда-либо курил, неизвестно) и статус употребления алкоголя (редко, умеренно, злоупотребление, неизвестно).

Используемые модели Пуассоновской регрессии имели вид:

$$\lambda = \lambda_0(s, aa, ct, smok, alc)(1 + \beta D_\gamma) \text{ и}$$

$$\lambda = \lambda_0(s, aa, ct, smok, alc)(1 + \beta D_\alpha),$$

где λ – показатель заболеваемости АГ; λ_0 – фоновый показатель заболеваемости АГ; s – пол; aa – достигнутый возраст; ct – календарный период; $smok$ – статус курения; alc – статус употребления алкоголя; β – ИОР/Гр; D_γ – суммарная поглощенная доза внешнего γ -излучения в печени, Гр; D_α – суммарная поглощенная доза α -излучения в печени, Гр.

Для оценки ИОР/Гр были также проведены анализы чувствительности:

– использование различных периодов лаггирования (5, 10 и 15 лет) для дозы внешнего и внутреннего облучения, при этом для анализов с заданными периодами лаггирования, в которых чел.-годы считались от начала работы, первые x лет после начала работы были отнесены к категории “нулевой дозы”;

– исключение поправок на статус курения и употребления алкоголя;

– включение поправок (с помощью стратификации) на дополнительные факторы: индекс массы тела (ИМТ) (ниже нормы, норма, выше нормы, неизвестно); продолжительность работы (<10 , ≥ 10 лет); индекс курения вместо статуса курения (неизвестно, 0, 0–10, 10–20, >20 пачка \times лет);

– включение поправок (с помощью стратификации) на дозу внутреннего облучения при анализе дозы внешнего радиационного воздействия и наоборот. В этом случае модели Пуассоновской регрессии имели вид:

$$\lambda = \lambda_0(s, aa, ct, smok, alc, d_\alpha)(1 + \beta D_\gamma) \text{ и}$$

$$\lambda = \lambda_0(s, aa, ct, smok, alc, d_\gamma)(1 + \beta D_\alpha),$$

где d_α – категориальная переменная суммарной поглощенной дозы α -излучения в печени, Гр; d_γ – категориальная переменная суммарной поглощенной дозы γ -излучения в печени, Гр. При поправке на дозу внутреннего облучения работники, для которых мониторинг активности не проводился, не исключались из анализа, а относились к отдельной категории “неизвестно”.

Также изучена модификация радиогенного риска заболеваемости АГ в зависимости от пола, достигнутого возраста и типа производства (критерии на гетерогенность). Кроме того, исследована зависимость риска от достигнутого возраста. В данном анализе было проведено сравнение ИОР/Гр с/без поправки на достигнутый возраст, центрированный к 50 годам (критерий на лог-линейный тренд ИОР/Гр с достигнутым возрастом).

Информацию о заводе учитывали за весь период наблюдения. К “плутониевому заводу” были отнесены работники, которые когда-либо работали на плутониевом заводе, к “радиохимическому заводу” были отнесены работники, которые работали на радиохимическом заводе, но никогда не работали на плутониевом заводе, к “реакторам” были отнесены работники, которые работали на реакторах, но никогда не работали на двух других заводах.

Сведения об отношении работников к курению учитывались за весь период наблюдения и оценивались с помощью качественного и количественного показателей. Качественный показатель принимал значения “неизвестно”, “никогда не курил”, “курил, но бросил”, “курил”. “Никогда не курившим” считали работников, которые в течение всего периода наблюдения при опросах во время медицинских обследований говорили, что никогда не курили. При стратификации категории “курил, но бросил” и “курил” объединялись в категорию “когда-либо курил”. В качестве количественного показателя был использован индекс курения. Индекс курения (ИК) вычисляли по формуле: ИК = количество пачек сигарет, выкуриваемых ежедневно \times продолжительность курения (лет). Индекс курения измерялся в еди-

ницах “пачка × лет” и был равен нулю у никогда не куривших работников.

Сведения об отношении работников к употреблению алкоголя учитывались также за весь период наблюдения и оценивались только с помощью качественного показателя, учитывающего количество употребляемого алкоголя. Отношение работников к употреблению алкоголя классифицировалось следующим образом: “редко” – если в течение периода наблюдения во время медицинских обследований работник говорил, что никогда не употреблял спиртные напитки или употреблял их редко и в небольших количествах; “умеренно” – если во время медицинских обследований работник так характеризовал свое отношение к употреблению алкоголя; “злоупотребление” – если в медицинской документации были зафиксированы бытовое пьянство или хронический алкоголизм; “неизвестно”.

Информация об ИМТ учтена на момент предварительного медицинского осмотра (до начала работы на одном из основных заводов ПО “Маяк”) для того, чтобы избежать ошибок смещения, так как в некоторых исследованиях было показано, что артериальное давление и уровни липидов зависят от накопленной дозы облучения. ИМТ рассчитывали по формуле: ИМТ = масса тела (кг)/рост (м)². Для интерпретации величины ИМТ пользовались классификацией ВОЗ. ИМТ < 18.5 кг/м² – дефицит массы тела; ИМТ 18.5–24.9 кг/м² – нормальная масса тела; ИМТ 25.0–29.9 кг/м² – избыточная масса тела; ИМТ ≥ 30 кг/м² – ожирение. В исследовании ИМТ включали как качественный показатель, который принимал значения “неизвестно”, “ниже нормы”, “норма”, “выше нормы”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На конец периода наблюдения в изучаемой когорте работников было верифицировано 8425 случаев АГ в течение 429 707 чел.-лет наблюдения.

Распределение случаев АГ в зависимости от пола и достигнутого возраста работников изучаемой когорты представлено в табл. 1.

Следует отметить, что 64.2% случаев АГ у мужчин и 73.0% случаев АГ у женщин обнаружено среди работников, подвергшихся внешнему воздействию γ -излучения в суммарной дозе <0.5 Гр. Средняя суммарная поглощенная в печени доза внешнего облучения у мужчин составила 0.45 ± 0.65 Гр (среднее \pm стандартное отклонение) и у женщин – 0.37 ± 0.56 Гр. Установлено, что почти половина случаев АГ (47.9%) выявлена у работников, подвергшихся внутреннему облучению в суммарной поглощенной в печени дозе <0.025 Гр, в то время как одна треть случаев АГ (31.8% у мужчин и 36.3% у женщин) наблюдалась у работни-

ков, подвергшихся внутреннему облучению в суммарной поглощенной в печени дозе 0.05–1.0 Гр. Средняя суммарная поглощенная в печени доза внутреннего облучения у мужчин составила 0.23 ± 0.65 Гр и у женщин – 0.44 ± 1.93 Гр.

Ранее было показано, что заболеваемость АГ в изучаемой когорте работников статистически значимо зависела от таких нерадиационных факторов, как достигнутый возраст, календарный период и возраст найма на предприятие, календарный период установления диагноза, продолжительность работы, индекс массы тела (ИМТ) [18, 19].

Результаты категориального анализа, представленные в табл. 2, показали повышенный статистически значимый риск заболеваемости АГ во всех дозовых категориях по сравнению с референс-категорией (работники, подвергшиеся хроническому внешнему облучению в суммарной поглощенной в печени дозе <0.1 Гр) за исключением последней дозовой категории (>4.0 Гр), что, по-видимому, связано с небольшим количеством случаев в этой группе (семь случаев). Следует отметить, что риск заболеваемости АГ возрастал с увеличением суммарной дозы внешнего облучения: от ОР = 1.11 (95%-ный ДИ 1.03; 1.19) в дозовой категории 0.1–0.2 Гр до ОР = 1.6 (95%-ный ДИ: 1.15; 2.17) в дозовой категории 3.0–4.0 Гр) (табл. 2).

При другом категориальном анализе (табл. 2) обнаружено, что у работников, подвергшихся внутреннему воздействию α -излучения в суммарной поглощенной в печени дозе 0.10–0.15, 0.25–0.5 и 0.5–1.0 Гр, заболеваемость АГ была выше при сравнении с работниками, подвергшимися облучению в дозе <0.01 Гр ($p < 0.05$). Причем риск заболеваемости АГ также возрастал с увеличением суммарной дозы внутреннего облучения, за исключением тех работников, кто подвергся воздействию α -излучения в дозе >1.0 Гр, что обусловлено небольшим количеством случаев АГ в этой группе (99 случаев).

Установлена статистически значимая линейная зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего γ -излучения с учетом поправок на нерадиационные факторы; ИОР/Гр = 0.14 (95%-ный ДИ 0.09; 0.20) – табл. 3 и рис. 1. Дополнительная поправка на дозу внутреннего облучения (α -частицы) не оказывала влияния на величину риска заболеваемости АГ в изучаемой когорте работников; ИОР/Гр = 0.14 (95%-ный ДИ 0.09; 0.20). Оценка риска заболеваемости АГ увеличивалась с увеличением периода лагирования, но уменьшалась при исключении поправок на статус курения и употребления алкоголя. Выявлено, что риск заболеваемости АГ увеличивался при включении в стратификацию дополнительных поправок на ИМТ и продолжительность работы, но не изме-

Таблица 2. ОР заболеваемости АГ в различных диапазонах суммарных поглощенных в печени доз внешнего γ -излучения и внутреннего α -излучения
Table 2. RR of hypertension incidence for various ranges of cumulative liver absorbed γ -ray doses of external exposure and α -particle doses of internal exposure

Диапазон дозы, Гр	Средняя доза, Гр	Чел.-лет	Число случаев	ОР (95%-ный ДИ)
Внешнее воздействие γ -излучения				
0.0–0.1	0.04	171290	2986	1
0.1–0.2	0.14	57964	1234	1.11 (1.03; 1.19)
0.2–0.5	0.32	78072	1662	1.10 (1.03; 1.17)
0.5–0.75	0.62	30819	659	1.13 (1.03; 1.23)
0.75–1.0	0.87	20977	452	1.13 (1.02; 1.26)
1.0–1.25	1.12	15367	350	1.21 (1.08; 1.36)
1.25–1.5	1.37	10910	251	1.27 (1.11; 1.45)
1.5–2.0	1.73	15037	336	1.22 (1.08; 1.38)
2.0–3.0	2.32	9939	252	1.41 (1.22; 1.61)
3.0–4.0	3.34	1550	41	1.60 (1.15; 2.17)
>4.0	4.39	509	7	0.72 (0.31; 1.40)
Внутреннее воздействие α -излучения				
0.00–0.01	0.003	101958	1686	1
0.01–0.025	0.016	33389	846	1.06 (0.97; 1.16)
0.025–0.05	0.036	22226	592	1.01 (0.91; 1.12)
0.05–0.10	0.071	17754	491	1.05 (0.94; 1.18)
0.10–0.15	0.122	8361	263	1.16 (1.01; 1.33)
0.15–0.25	0.193	8194	275	1.14 (0.99; 1.31)
0.25–0.50	0.348	6650	244	1.23 (1.06; 1.42)
0.5–1.00	0.695	3416	130	1.33 (1.09; 1.60)
>1.00	3.187	3336	99	1.08 (0.87; 1.34)

нялся при введении поправки на индекс курения вместо статуса курения (табл. 3).

Оценки ИОР/Гр внешнего облучения для заболеваемости АГ были примерно одинаковыми у мужчин и женщин изучаемой когорты ($p > 0.05$). Примерно одинаковые оценки риска получены на всех типах производства, и статистически значимых различий между ними не выявлено ($p = 0.39$). Не установлено модификации риска заболеваемости АГ продолжительностью работы ($p = 0.16$). Несмотря на то, что оценка ИОР/Гр внешнего облучения для заболеваемости АГ возрастала с увеличением достигнутого возраста, не выявлено статистически значимого тренда ($p = 0.28$) – табл. 3.

Анализ заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внутреннего облучения не выявил статистически значимой зависимости при использовании линейной модели с учетом поправок на нерадиационные факторы (табл. 3). При основном анализе, учитывающем весь диапазон доз, ИОР/Гр внутреннего облучения для заболеваемости АГ составил -0.01 (95%-ный ДИ n/a ; 0.05). Невозможно оценить влияние различ-

ных периодов лагирования в связи с неопределенной оценкой нижней границы 95%-ного ДИ. Исключение поправок на статус курения и употребления алкоголя, введение поправок на дополнительные нерадиационные факторы (ИМТ, продолжительность работы, индекс курения вместо статуса курения) и дозу внешнего облучения не оказали влияния на полученный результат. Также не установлено модификации риска заболеваемости АГ полом индивида, типом производства, достигнутым возрастом и продолжительностью работы ($p = 0.09$, $p = 0.18$, $p > 0.5$, $p > 0.5$ соответственно) – табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования свидетельствовали о повышенном риске заболеваемости АГ во всех диапазонах суммарных доз внешнего облучения >0.1 Гр по сравнению с референс-категорией (<0.1 Гр). Риск заболеваемости АГ увеличивался с возрастанием суммарной дозы внешнего облучения, и наиболее высокий риск выявлен у работников, подвергшихся облучению

Таблица 3. Результаты анализа заболеваемости АГ в зависимости от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего облучения и внутреннего облучения
Table 3. Results of the analysis of hypertension incidence in relation to cumulative liver absorbed γ -ray dose of external exposure and α -particle dose of internal exposure

Анализ	ИОР/Гр (95% ДИ)	
	внешнее γ -облучение	внутреннее α -облучение
Основной анализ (лаг-период 0 лет)	0.14 (0.09; 0.20)	-0.01 (n/a; 0.05)
Анализ с другими лаг-периодами:		
лаг-период 5 лет	0.15 (0.09; 0.21)	-0.003 (n/a; 0.08)
лаг-период 10 лет	0.17 (0.11; 0.24)	0.01 (n/a; 0.11)
лаг-период 15 лет	0.19 (0.12; 0.26)	0.02 (n/a; 0.16)
Анализ с исключением поправки на курение и употребление алкоголя, лаг-период 0 лет	0.13 (0.08; 0.19)	-0.01 (n/a; 0.05)
Анализ с добавлением в стратификацию (лаг-период 0 лет):		
индекс массы тела	0.17 (0.12; 0.24)	-0.01 (n/a; 0.06)
продолжительность работы	0.17 (0.11; 0.23)	-0.004 (n/a; 0.07)
индекс курения	0.14 (0.08; 0.20)	-0.01 (n/a; 0.05)
доза внутреннего α -излучения при анализе внешнего и наоборот	0.14 (0.09; 0.20)	-0.02 (n/a; 0.04)
Анализ, ограниченный работниками (лаг-период 0 лет):		
Реакторный завод	0.19 (0.04; 0.37)	—
Радиохимический завод	0.18 (0.10; 0.27)	0.07 (n/a; 0.27)
Завод по производству плутония	0.18 (0.04; 0.34)	-0.02 (n/a; 0.04)
Тест на гетерогенность между работниками различных заводов	$p_1 = 0.39$	$p_1 = 0.18$
Продолжительность работы:		
<1 года	0.17 (n/a; 0.96)	1.11 (n/a; 22.19)
1–5	0.21 (0.08; 0.36)	0.06 (n/a; 0.43)
5–10	0.12 (0.02; 0.26)	-0.03 (n/a; 0.16)
10–20	0.12 (0.02; 0.25)	-0.05 (n/a; 0.04)
20–30	0.25 (0.11; 0.42)	0.02 (n/a; 0.15)
30+	0.13 (0.01; 0.30)	0.14 (n/a; 0.49)
Тест на гетерогенность между работниками с различной продолжительностью работы	$p_2 = 0.16$	$p_2 > 0.50$
Мужчины	0.15 (0.09; 0.22)	0.10 (-0.04; 0.27)
Женщины	0.14 (0.05; 0.24)	-0.03 (n/a; 0.03)
Тест на гетерогенность между мужчинами и женщинами	$p_3 > 0.50$	$p_3 = 0.09$
Работники с достигнутым возрастом:		
<40	0.06 (n/a; 0.18)	0.07 (n/a; 0.45)
40–49	0.11 (0.01; 0.24)	-0.03 (n/a; 0.05)
50–59	0.14 (0.04; 0.25)	-0.03 (n/a; 0.07)
60–69	0.26 (0.14; 0.41)	0.07 (n/a; 0.25)
70+	0.16 (0.02; 0.34)	-0.03 (n/a; 0.20)
Тест на гетерогенность между группами работников различного достигнутого возраста	$p_4 = 0.22$	$p_4 > 0.50$
Тест на лог-линейный тренд ИОР/Гр по достигнутому возрасту	$p_5 = 0.28$	$p_5 > 0.50$

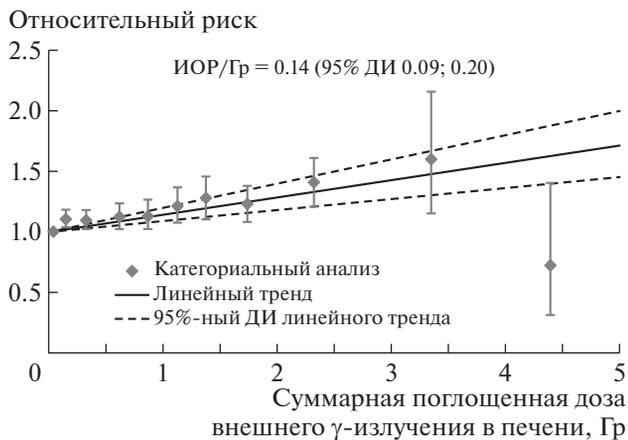


Рис. 1. Зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего воздействия γ -излучения.

Fig. 1. Hypertension incidence association with cumulative liver absorbed γ -ray dose of external exposure.

в суммарной дозе более 3.0 Гр (ОР = 1.60 (95%-ный ДИ: 1.15–2.17)). Повышенный статистически значимый риск заболеваемости АГ обнаружен также у работников, подвергшихся внутреннему воздействию α -излучения в суммарных поглощенных в печени дозах более 0.01 Гр, по сравнению с референс-категорией (<0.01 Гр).

В результате анализа доза–эффект обнаружена статистически значимая линейная зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего облучения, ИОР/Гр составил 0.14 (95%-ный ДИ 0.09; 0.20) как с поправкой, так и без поправки на дозу внутреннего облучения.

Сравнение полученных результатов с таковыми, полученными в других работах, было затруднено в связи с тем, что исследования зависимости доза–эффект для заболеваемости АГ крайне ограничены; к тому же исследователи изучали разные подтипы АГ и их комбинаций. Так, впервые повышенный риск смертности от АГ показан в исследовании японской когорты лиц, выживших после атомной бомбардировки (когорта LSS) [20] – табл. 4. В когорте 85 600 человек, наблюдавшихся в период 1950–1990 гг., обнаружен избыточный относительный риск смертности от АГ на единицу дозы (ИОР/Зв = 0.21 (95%-ный ДИ 0.00; 0.45)). В другом исследовании с расширенным периодом наблюдения до 2003 г. в этой же когорте была показана статистически значимая зависимость смертности, вызванной АГ (МКБ-9 коды: 402, 404), от дозы облучения; ИОР/Гр = 0.37 (95%-ный ДИ 0.08; 0.72) [8]; а при расширении периода наблюдения до 2008 г. ИОР/Гр составил 0.36 (95%-ный ДИ 0.10; 0.68) [7]. В исследовании, посвященном изучению здоровья лиц, выживших после атомной бомбардировки в другой

японской когорте (когорта AHS), обнаружена статистически значимая квадратичная зависимость заболеваемости АГ (401 код МКБ-9 или I10 код МКБ-10) от дозы облучения; ИОР/Гр = 0.03 (95%-ный ДИ 0.01; 0.06) [21].

Результаты исследования когорты ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС), включающей 61017 лиц, и наблюдавшихся в период 1986–2000 гг., свидетельствуют о статистически значимом повышенном риске заболеваемости АГ (401 код МКБ-9 или I10 код МКБ-10); ИОР/Гр = 0.36 (95%-ный ДИ 0.005; 0.71) [22] – табл. 4. При расширении периода наблюдения до 2012 г. в субкогорте ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (53704 человека), которые начали работу в зоне аварии в период с 26 апреля 1986 г. по 25 апреля 1987 г., была обнаружена статистически значимая зависимость заболеваемости АГ (401–405 коды МКБ-9 или I1–I15 коды МКБ-10) от дозы внешнего облучения; ИОР/Гр = 0.26 (95%-ный ДИ 0.12; 0.41) [9].

В целом можно отметить, что оцененный риск заболеваемости АГ в когорте работников ПО “Маяк”, подвергшихся хроническому внешнему облучению, был выше такового в когорте лиц, выживших после атомной бомбардировки в Японии (AHS), но ниже, чем в когорте ликвидаторов последствий радиационной аварии на ЧАЭС (табл. 4). Это может быть связано с рядом причин и, прежде всего, с существенными различиями сценариев облучения: члены японской когорты подверглись острому однократному облучению с высокой мощностью дозы; ликвидаторы последствий радиационной аварии на ЧАЭС – кратковременному (дни и месяцы) облучению в умеренных дозах, а работники ПО “Маяка” – хроническому воздействию радиации в диапазоне умеренных и низких доз (но с низкой мощностью дозы) на протяжении многих лет.

Что касается оценок влияния внутреннего облучения от инкорпорированного плутония на заболеваемость АГ, в доступной нам литературе такие сведения отсутствуют, поэтому мы не можем сравнить полученные результаты с другими подобными данными. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о повышенном ОР заболеваемости АГ в отдельных диапазонах доз внутреннего облучения (0.10–0.15 Гр; 0.25–0.5 Гр; 0.5–1.0 Гр). В то же время не выявлена статистически значимая зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внутреннего облучения, что обусловлено, в первую очередь, отсутствием оценок доз облучения на большую часть когорты (68.9%) и существенными неопределенностями поглощенных доз при таком облучении, о чем неоднократно было указано ранее [23].

Настоящее исследование, как и предыдущие работы по БСК [3–6], имеет ряд существенных преимуществ: большая численность изучаемой

Таблица 4. Сравнение полученных результатов с результатами других исследований
 Table 4. Comparison of the observed findings with findings of other studies

Исследование	Ссылки	Количество субъектов	Период наблюдения	Средняя доза и диапазон, Зв	Исследуемый эффект (коды МКБ-9)	Число конечных точек	ИОР/Гр
Life Span Study, LSS (смертность)	Shimizu et al., 1999	86.572	1950–1990	0.1 (0–4)	АГ (401–405)	1199	0.21 (0.00; 0.45) $p = 0.003$
	Shimizu et al., 2010	86.611	1950–2003	0.1 (0–4)	АГ с поражением сердца (402, 404) АГ без поражения сердца (401, 403, 405)	922 411	0.37 (0.08; 0.72) $p = 0.009$ 0.07 (–0.22; 0.55) $p > 0.5$
	I. Takahashi et al., 2017	86.600	1950–2008	0.1 (0–4)	АГ с поражением сердца и почек (402–404) АГ с поражением сердца (402) АГ с поражением почек (403) АГ с одновременным поражением сердца и почек (404)	1122 879 174 69	0.36 (0.10; 0.68) $p = 0.004$ 0.37 (0.07; 0.73) 0.39 (–0.15; 1.30) 0.26 (–0.79; 1.31)
Adult Health Study, AHS (заболеваемость) Результат в скобках – без поправки на курение и алкоголь	Yamada et al., 2004	10.339	1958–1998 (1958–1960; 1996–1998)	0.1 (0–4)	АГ (401) – линейная модель	5.035	0.05 (–0.01; 0.10) $p = 0.08$ (0.04 (–0.01; 0.09) $p = 0.14$) 0.03 (0.01; 0.06) $p = 0.01$ (0.03 (n/a; 0.06) $p = 0.028$) –0.01 (–0.09; 0.09) $p = 0.87$ (0.01 (–0.08; 0.10) $p = 0.86$)
	V.K. Ivanov et al., 2006	61.017	1986–2000	0.109 (0...>0.5)	АГ (401–405) АГ (401) АГ с поражением сердца (402, 404) – линейная модель	15.484 11.910 7.680	0.26 (–0.04; 0.56) $p = 0.08$ 0.36 (0.005; 0.71) $p = 0.04$ 0.04 (–0.36; 0.44) $p = 0.85$
Когорта работников ПО “Маяк”, впервые нанятых в 1948–1982 гг., (заболеваемость)	В.К. Иванов и др., 2017	53.704 (когорта А)	1986–2012	0.161	АГ (401–405)	29.695	0.26 (0.12; 0.41) $p < 0.001$
	Настоящее исследование	22.377	1948–2013	0.45 ± 0.65 Гр (муж.) 0.37 ± 0.56 Гр (жен.)	АГ (401–404) – линейная модель	8425	0.14 (0.09; 0.20)

когорты (22377 человек); длительный период наблюдения (1948–2013 гг.), гетерогенность когорты по полу и возрасту; индивидуальные измеренные дозы облучения в результате профессиональной деятельности и достаточная статистическая мощность исследования. Одним из главных преимуществ является то, что все работники изучаемой когорты, независимо от места работы, профессии и дозы облучения, проходили обязательные ежегодные медицинские обследования. Кроме этого, во время медицинских осмотров проводили измерения АД, роста и веса тела, а также опрос о вредных привычках, в первую очередь о курении и употреблении алкоголя, и эта очень важная информация доступна для преобладающего большинства работников изучаемой когорты (95%).

Недостатками исследования является ограничение анализа периодом проживания в г. Озерск, так как информация о перенесенных заболеваниях и нерадиационных факторах недоступна для мигрантов; отсутствие измерений α -активности в биосубстратах у большинства работников изучаемой когорты (68.9%) и существенная неопределенность оценок поглощенных в органах доз внутреннего облучения.

В рамках настоящего исследования не проводился анализ смертности от АГ, как основной причины смерти, из-за небольшого числа смертей от АГ среди членов изучаемой когорты (101 смерть) и, как следствие, недостаточной статистической мощности.

Наблюдение за когортой работников ПО “Маяк” продолжается, и на следующем этапе исследования мы планируем оценить риск смертности от АГ и риск заболеваемости отдельными подтипами АГ, расширив период наблюдения, а также используя уточненные оценки доз (новая дозиметрическая система – “ДСРМ-2016”) работников ПО “Маяк”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что заболеваемость АГ в когорте работников ПО “Маяк”, подвергшихся хроническому облучению с низкой суммарной дозы, зависела от суммарной дозы внешнего облучения. Установлена статистически значимая линейная зависимость заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внешнего облучения; ИОР/Гр = 0.14 (95%-ный ДИ 0.09; 0.20).

Не выявлено статистически значимой зависимости заболеваемости АГ от суммарной поглощенной в печени дозы внутреннего облучения; ИОР/Гр = -0.01 (95%-ный ДИ *n/a*; 0.05).

Риск заболеваемости АГ в изучаемой когорте работников был выше такового в японской когорте лиц, выживших после атомной бомбардировки (АHS), но ниже, чем в когорте ликвидаторов последствий радиационной аварии на ЧАЭС. Эти различия обусловлены, прежде всего, существенными различиями сценариев облучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. МКБ-9. Руководство по кодированию заболеваний, травм и причин смерти. Пересмотр 1975. Женева: ВОЗ, 1980. 752 с. [ICD-9 Guidelines for coding diseases, injuries and causes of death/revision 1975. Geneva, WHO, 1980. 752 p.]
2. Effects of ionizing radiation. UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly, with scientific annexes. Volume I. New York: United Nations, 2008. 392 p.
3. *Moseeva M.B., Azizova T.V., Grigoryeva E.S., Haylock R.G.* Risks of circulatory diseases among Mayak PA workers with radiation doses estimated using the improved Mayak Worker Dosimetry System 2008 // *Radiat. Environ. Biophys.* 2014. V. 53. № 2. P. 469–477. <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0517-x>
4. *Azizova T.V., Haylock R.G., Moseeva M.B., et al.* Cerebrovascular diseases incidence and mortality in an extended Mayak worker cohort 1948–1982 // *Radiat. Res.* 2014. V. 182. № 5. P. 529–544. <https://doi.org/10.1667/RR13680.1>
5. *Azizova T.V., Grigoryeva E.S., Haylock R.G., et al.* Ischemic heart disease incidence and mortality in an extended cohort of Mayak workers first employed in 1948–1982 // *Br. J. Radiol.* 2015. V. 88. № 1054. P. 20150169. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150169>
6. *Azizova T.V., Bannikova M.V., Grigorieva E.S., et al.* Risk of lower extremity arterial disease in a cohort of workers occupationally exposed to ionizing radiation over a prolonged period // *Radiat. Environ. Biophys.* 2016. V. 55. № 2. P. 147–159. <https://doi.org/10.1007/s00411-016-0645-6>
7. *Takahashi I., Shimizu Y., Grant E.J., et al.* Heart Disease Mortality in the Life Span Study, 1950–2008 // *Radiat. Res.* 2017. V. 187. № 3. P. 319–332. <https://doi.org/10.1667/RR14347.1>
8. *Shimizu Y., Kodama K., Nishi N., et al.* Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950–2003 // *BMJ.* 2010. № 340. P. 534–539. <https://doi.org/10.1136/bmj.b5349>
9. *Иванов В.К., Чекин С.Ю., Максютов М.А. и др.* Радиационный риск заболеваемости гипертониями среди российских участников ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС // *Мед. радиология и радиац. безопасность.* 2017. Т. 62. № 1. С. 32–37. [*Ivanov V.K., Chekin S.Yu., Maksyutov M.A. et al.* Radiation risk of incidence of hypertension among Russian recovery operation workers of the Chernobyl accident. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2017. V. 62. № 1. P. 32–37. (in Russian)] <https://doi.org/10.12737/25050>
10. *Gillies M., Richardson D.B., Cardis E., et al.* Mortality from Circulatory Diseases and other Non-Cancer Outcomes among Nuclear Workers in France, the United Kingdom and the United States (INWORKS) // *Radiat. Res.* 2017. V. 188. № 3. P. 276–290. <https://doi.org/10.1667/RR14608.1>

11. *Little M.P.* Radiation and circulatory disease // *Mutat. Res.* 2016. V. 770. Pt. B. P. 299–318. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.008>
12. *Azizova T.V., Day R.D., Wald N. et al.* The “clinic” medical-dosimetric database of Mayak production association workers: Structure, characteristics and prospects of utilization // *Health Phys.* 2008. V. 94. № 5. P. 449–458. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000300757.00912.a2>
13. *Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K. et al.* Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // *J. Hypertens.* 2013. V. 31. № 7. P. 1281–1357. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001940>
14. *Vasilenko E.K., Scherpelz R.I., Gorelov M.V. et al.* External Dosimetry Reconstruction for Mayak Workers. AAHP Special Session Health Physics Society Annual Meeting, 2010. URL: http://www.hps1.org/aahp/public/AAHP_Special_Sessions/2010_Salt_Lake_City/pm-1.pdf (дата обращения 01.11.2016).
15. *Napier B.A.* The Mayak Worker Dosimetry System (MWDS-2013): an introduction to the documentation // *Radiat. Prot. Dosim.* 2017. V. 176. № 1–2. P. 6–9. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncx020>
16. *Fountos B.N.* The Department of Energy’s Russian Health Studies Program // *Radiat. Prot. Dosim.* 2017. V. 176. № 1–2. P. 3–5. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncw110>
17. *Preston D., Lubin J., Pierce D., McConney M.* *Epicure Users Guide.* Seattle, WA: Hirosoft International Corporation, 1993. 335 p.
18. *Кузнецова К.В., Азизова Т.В., Банникова М.В.* Артериальная гипертензия в когорте работников атомной промышленности // *Радиация и риск.* 2018. Т. 27. № 2. С. 86–96. [*Kuznetsova K.V., Azizova T.V., Bannikova M.V.* Hypertension incidence among workers at the Mayak nuclear complex // *Radiation & Risk.* 2018. V. 27. № 2. P. 86–89. (in Russian)] <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-2-86-96>
19. *Кузнецова К.В., Азизова Т.В., Банникова М.В. и др.* Показатели заболеваемости артериальной гипертензией в когорте работников атомной промышленности // *Артериальная гипертензия.* 2016. № 22(3). С. 299–308. [*Kuznetsova K.V., Azizova T.V., Bannikova M.V. et al.* Arterial hypertension incidence rates in a cohort of nuclear workers // *Arterial Hypertension.* 2016. V. 22. №3). P. 299–308. (in Russian)] <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2016-22-3-299-308>
20. *Shimizu Y., Pierce D.A., Preston D.L. et al.* Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, part II. Noncancer mortality: 1950–1990 // *Radiat. Res.* 1999. V. 152. № 4. P. 374–389.
21. *Yamada M., Wong F.L., Fujiwara S. et al.* Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958 – 1998 // *Radiat. Res.* 2004. V. 161. № 6. P. 622–632. <https://doi.org/10.1667/rr3183>
22. *Ivanov V.K., Maksioutov M.A., Chekin S.Y. et al.* The risk of radiation-induced cerebrovascular disease in Chernobyl emergency workers // *Health Phys.* 2006. V. 90. № 3. P. 199–207. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000175835.31663.ea>
23. *Азизова Т.В., Хэйлок Р., Мосеева М.Б. и др.* Риск заболеваемости и смертности от cerebrovascularных заболеваний в когорте работников ПО “Маяк”: 1948–1982 // *Мед. радиология и радиац. безопасность.* 2015. Т. 60. № 4. С. 43–61 [*Azizova T.V., Haylock R., Moseeva M.B. et al.* Cerebrovascular disease incidence and mortality in an extended Mayak worker cohort: 1948–1982 // *Medical radiology and radiation safety.* 2015. V. 60. № 4. P. 43–61. (in Russian)]

Hypertension Incidence Risk in a Cohort of “Mayak” PA Workers Exposed to Radiation over Prolonged Periods

T. V. Azizova^{a, #}, K. V. Briks^a, M. V. Bannikova^a, and E. S. Grigoryeva^a

^a Southern Urals Biophysics Institute, Ozyorsk, Russia

[#]E-mail: clinic@subi.su

Objective – to assess hypertension (ICD-9 codes 401–404 or ICD-10 codes I10–I13) incidence risk in a cohort of workers occupationally exposed to ionizing radiation over prolonged periods. The hypertension incidence risk was analyzed in a cohort of workers of the nuclear production facility Mayak Production Association (PA) (22377 individuals) who had been chronically exposed to external γ - and internal α -radiation. Mean cumulative liver absorbed doses from external γ -rays were 0.45 ± 0.65 Gy in males and 0.37 ± 0.56 Gy in females, whereas doses from internal α -particles were 0.23 ± 0.65 and 0.44 ± 1.93 Gy in males and females, respectively. An excess relative risk per unit dose (ERR/Gy) was calculated based on Poisson regression analysis. The excess relative risk (ERR), i.e. risk minus 1, was described as a linear trend with external and internal radiation exposure doses including adjustments for non-radiation factors (sex, attained age, calendar period, smoking status, alcohol consumption). As of the end of the follow-up period, 8425 hypertension cases were verified in the cohort (5745 cases (68.2%) in males and 2680 cases (31.8%) in females). Hypertension incidence was found to be significantly linearly associated with cumulative liver absorbed dose from external γ -rays: ERR/Gy = 0.14 (95% CI 0.09; 0.20). No significant association of hypertension incidence with cumulative liver absorbed dose from internal α -particles was found: ERR/Gy = –0.01 (95% CI non-available; 0.05). Hypertension incidence risk in the study cohort was higher compared to the Japanese cohort of atomic bomb survivors (AHS [Adult Health Study]) but lower compared to Chernobyl clean-up workers.

Key words: risk, incidence, hypertension, occupational radiation exposure, “Mayak” worker cohort

КЛЕТочНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ

УДК 616.091.8:615.03:57.085.23: 539.1.047

ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ И РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ D-ГЛЮКОЗАМИНА НА КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

© 2021 г. Н. Я. Гильяно^{1,*}, М. М. Дуботолова¹, Л. А. Носкин¹, Л. В. Коневега¹,
С. И. Степанов¹, Ф. М. Ибатуллин¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ “Курчатовский институт”,
Гатчина, Россия

*E-mail: gilyano_nj@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 14.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

На трех линиях клеток человека исследовали роль цитостатического фактора в цитотоксическом эффекте γ -облучения до и после обработки клеток ингибитором гликолиза D-глюкозамин (GlcN). Показано, что обработка клеток GlcN приводила к аккумуляции клеток в G_1 -фазе клеточного цикла. Предрадиационная обработка клеток GlcN приводит к значительному (более чем в 2 раза) увеличению доли апоптотически гибнущих опухолевых клеток (линий HeLa G 63, Her G2) по сравнению с отдельным воздействием, чего не наблюдается для неопухолевых клеток (ECV 304). GlcN индуцировал селективно направленную радиосенсибилизацию опухолевых клеток. Синергический эффект регистрировался через 48 ч после облучения. Предполагается, что GlcN ингибирует АТФ зависимые пострадиационные репарационные процессы.

Ключевые слова: клеточный цикл, γ -кванты ⁶⁰Co, апоптоз, D-глюкозамин (GlcN), цитометрия, культура клеток человека

DOI: 10.31857/S0869803121020089

D-глюкозамин, природный аминсахар, являясь важной компонентой гликопротеинов, протеогликанов и глюкозаминогликанов. Показана его антиоксидантная и противовоспалительная способность. Молекулярный механизм противоспалительного действия D-глюкозамина состоит в ингибировании транслокации внутрь клеточного ядра транскрипционного фактора NF- κ B посредством связывания с рецептором CD44. Взаимодействуя с белком CD44, D-глюкозамин активирует внутриклеточные сигнальные процессы и влияет на синтез других белков протеома [1, 2]. Более полувека назад была показана противоопухолевая активность D-глюкозамина [3]. Показана токсичность D-глюкозамина для нескольких малигнанных клеточных линий и *in vivo* опухолей при концентрациях, имеющих малый эффект на нормальные клетки [4–6]. Известно, что D-глюкозамин ингибирует гликолиз, снижая активность гексокиназы. Показано, что ингибиторы гликолиза нарушают прогрессию клеток по циклу, аккумулируя их либо в G_1 , либо в G_2/M фазах клеточного цикла [6–8]. Регуляция клеточного цикла является важным фактором, модифицирующим радиочувствительность клеток. Блокирование прогрессии клеток по циклу способствует

частичной синхронизации их и последующее облучение может привести к увеличению цитотоксического эффекта ионизирующего излучения.

Радиомодифицирующий эффект ингибиторов гликолиза интенсивно исследуется как *in vitro*, так и *in vivo*, но в основном это касается 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG) [7, 9, 10]. Показано, что 2-DG селективно усиливает радиационно-индуцированные повреждения в опухолевых клетках, не влияя на нормальные клетки [10, 11]. Исследований, оценивающих влияние нетоксичных концентраций GlcN на радиочувствительность опухолевых клеток, в доступных нам источниках информации не обнаружено.

Ранее нами была показана повышенная чувствительность клеток карциномы шейки матки (линия HeLa G63) к двум аналогам глюкозы D-глюкозамину и 2-DG при концентрациях (1.5; 3; 5; 10 ммоль/л), нетоксичных для эндотелиоцитов (линия ECV 304). Оба аналога со сходным механизмом действия при этих концентрациях включали в клетках различные чек-пойнты: GlcN блокировал клетки в G_1 -фазе, а 2-DG – в G_2/M . При сочетанной обработке клеток GlcN и 2-DG регистрировали большую гибель опухолевых клеток, чем при отдельном воздействии. Предполагает-

ся, что синергетический эффект при сочетанной обработке является результатом блокирования пролиферации сразу в двух точках клеточного цикла [6].

Цель работы заключалась в оценке цитостатического и радиомодифицирующего действия GlcN при облучении трех клеточных линий человека γ -квантами ^{60}Co .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на клетках карциномы шейки матки (линия HeLa G 63), гепатокарциномы (линия Hep G2) и на эндотелиоцитах (линия ECV 304) человека. В клетках линии Hep G2 отсутствует активность NAPRT (NA-фофорибозил трансфераза). Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл) ("Биолот").

Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. В работе использованы гидрохлорид D-глюкозамина и 2-дезоксид-D-глюкоза ("Sigma"). Для обработки клеток готовили 1-молярные растворы (моль/л) этих агентов в питательной среде, из которых затем готовили растворы исследуемых концентраций (3 и 10 ммоль/л). Обработку клеток проводили в течение 24 ч до облучения γ -квантами ^{60}Co . Цитометрический и морфологический анализы эффективности обработки клеток растворами ингибиторов гликолиза и γ -квантами ^{60}Co проводили через 48 ч.

Облучение клеток γ -квантами ^{60}Co проводили на установке "Исследователь" ПИЯФ им. Б.П. Константинова при мощности дозы 7 Гр/мин. Минимальная доза, технически достижимая на данной установке при проведении экспериментов, была 6.7 Гр (спуск-подъем образца 57 с; погрешность в определении дозы в пределах 10–15%). Дозовые характеристики установки проверяются ежегодно службой дозиметрии ПИЯФ им. Б.П. Константинова с использованием ферросульфатного метода, последнее измерение проводили за неделю до облучения.

Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 96%-ным этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и учитывали морфологические изменения, такие как фрагментация ядер, наличие микроядер, вакуолизация цитоплазмы с помощью светового микроскопа "Motic" (Китай) или прижизненно окрашивали DAPI или Hoechst 33242 и анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого образца анализировали не менее 1000 клеток. Для проточно-цитометрического анализа, проведенного на двух цитометрах (FACS, США, и

экспериментальном приборе, созданном в лаборатории медицинской биофизики ПИЯФ им. Б.П. Константинова), клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена ("Биолот"). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе, содержащем 0.1% бромистого этидия и оценивали распределение клеток по содержанию ДНК, которое позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с – G_1 -фаза; 3с – S-фаза; 4с – G_2/M -фазы, так и оценить цитотоксичность препаратов, анализируя долю клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub- G_1 -популяцию), возникающую в результате фрагментации ядра в процессе апоптотической гибели клеток [12].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Эксперимент повторяли не менее 3 раз. В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Каждая точка представляет среднее арифметическое значение 3–5 повторов (%) \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Сравнение средних значений проводили с помощью t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми принимали отличия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты 24-часовой обработки клеток 3 ммоль/л GlcN и видно накопление клеток в G_1 -фазе клеточного цикла в большей степени при обработке клеток карциномы HeLa G 63 и Hep G2 (70%) и в меньшей клеток ECV 304 (60%). Эти результаты подтверждают данные других исследователей [8] и наши ранее полученные данные, из которых следовало, что GlcN при этой концентрации (3 ммоль/л) блокирует прогрессию клеток по циклу, что и приводило к аккумуляции клеток в G_1 -фазе, в отличие от второго ингибитора гликолиза 2-DG, обработка которым приводила к аккумуляции клеток в G_2/M -фазах клеточного цикла [6, 13].

На рис. 2 представлены гистограммы одного из трех экспериментов по оценке влияния γ -квантов, испускаемых при распаде ^{60}Co , на изменения в распределении клеток по содержанию ДНК через 24 ч после облучения. На гистограммах также приведены средние значения этого распределения по трем независимым экспериментам для клеток линии Hep G2 и по пяти независимым экспериментам для клеток HeLa G63 и ECV 304. Из гистограмм видно, что облучение клеток ^{60}Co в дозе 7 Гр приводило к аккумуляции клеток в G_2/M [4с = 75–88%] фазах клеточного цикла вне зависимости от типа клеток. При этом доля клеток с содержанием ДНК <2с (клетки с фрагментированными ядрами) увеличивалась незначи-

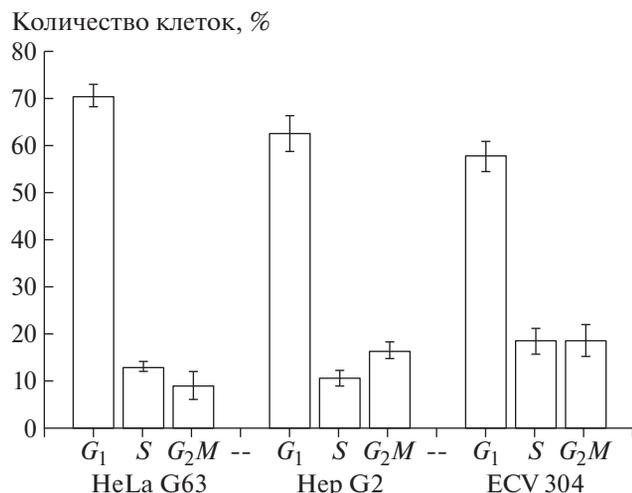


Рис. 1. Распределение клеток HeLa G63, Hep G2, ECV 304 по фазам клеточного цикла после 24-часовой обработки их 3 ммоль/л раствором GlcN.

Fig. 1. The distribution of HeLa G63, Hep G2, ECV 304 cells according to the phases of the cell cycle after 24 hours of processing them with 3 mmol/l GlcN.

тельно (в пределах 1%) при фиксации клеток через 24 ч после облучения, что может свидетельствовать о том, что этого времени недостаточно для реализации программы радиационно-индуцированного апоптоза. Следует отметить, что клетки линии Hep G2 оказались более чувствительны к действию ионизирующего излучения, поскольку уровень клеток с содержанием ДНК <2с увеличился вдвое с 6% без облучения до 12.8% после об-

лучения по сравнению с необлученным контролем.

При увеличении временного интервала между облучением и фиксацией клеток до 48 ч распределение клеток по содержанию ДНК существенно отличается от фиксации клеток через 24 ч. Результаты представлены на рис. 3, из которого видно, что острое облучение γ -квантами ^{60}Co в дозе 7 Гр с последующей 48-часовой инкубацией клеток приводило к снижению доли клеток, аккумулярованных в G_2/M (4с), по сравнению с фиксацией через 24 ч после облучения и увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с во всех линиях. Быстрее всех выходили из блока G_2/M клетки линии Hep G2, а медленнее клетки линии ECV 304, у которых даже после 48 ч после облучения 67% клеток находились в G_2/M -фазах.

Предрадиационная инкубация клеток HeLa G63 с GlcN в концентрации 3 ммоль/л приводила к существенному увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с (в 7 раз по сравнению с облучением без GlcN и в 3 раза по сравнению с GlcN без облучения), т.е. предобработка клеток GlcN более чем в 2 раза увеличивала долю клеток с содержанием ДНК <2с. Вдвое снижалась доля клеток, заблокированных в G_2/M (4с) $61.7 \pm 1.9\%$ только при облучении и $32.3 \pm 0.4\%$ при (GlcN + облучение). Очевидно, что в апоптоз уходят клетки заблокированные в фазах G_2/M (4с).

Для клеток линии Hep G2 предрадиационная инкубация с GlcN привела к увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с вдвое $24.6 \pm 3.8\%$ по сравнению с GlcN $10.3 \pm 1.9\%$ и втрое по срав-

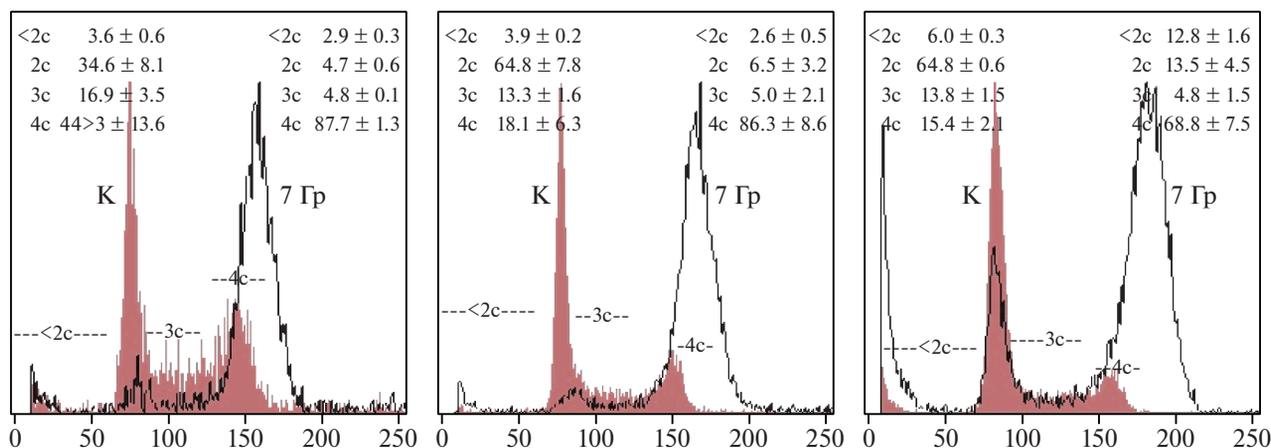


Рис. 2. Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК до и после облучения γ -квантами ^{60}Co в дозе 7 Гр одного из пяти экспериментов.

Заштрихованная гистограмма – без облучения, не заштрихованная – через 24 ч после облучения γ -квантами ^{60}Co в дозе 7 Гр.

Fig. 2. Histograms of the distribution of cells by DNA content before and after irradiation with γ -quantum of ^{60}Co rays at a dose of 7 Gy of one of 5 experiments.

The shaded histogram – without irradiation, not shaded – 24 hours after irradiation with γ -quantum of ^{60}Co at a dose of 7 Gy.

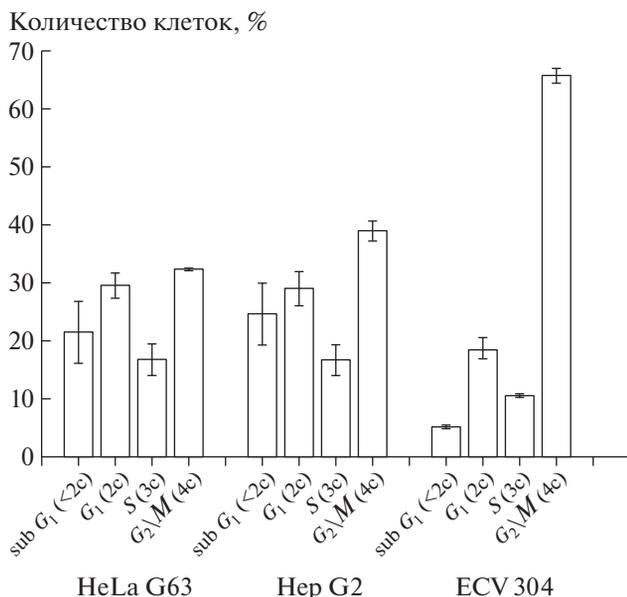


Рис. 3. Распределение клеток по фазам клеточного цикла через 48 ч после облучения γ -квантами ^{60}Co в дозе 7 Гр и обработки 3 ммоль/л GlcN.

Fig. 3. Distribution of cells according to the phases of the cell cycle 48 hours after irradiation with γ -quantum of ^{60}Co at a dose of 7 Gy and treatment with a 3 mmol/l GlcN.

нению с облучением $7.6 \pm 0.5\%$. Коэффициент синергизма для линии Hep G2, рассчитанный как отношение величины доли клеток с содержанием ДНК $<2c$ при сочетанном воздействии к сумме величин при раздельном воздействии, был 1.37. Существенно снижалась доля клеток как в G_1 -фазе, так и в G_2/M , что позволяет предположить, что фракция погибающих клеток увеличилась за счет клеток из этих фаз клеточного цикла.

Для клеток линии ECV 304 увеличение временного интервала между облучением и фиксацией клеток также привело к снижению доли клеток, заблокированных в G_2/M , с $87.7 \pm 1.3\%$ через 24 ч до $67.4 \pm 3.1\%$ через 48 ч после облучения. Однако, в отличие от клеток HeLa G63 и Hep G2, прерадиационная инкубация клеток ECV 304 с 3 ммоль/л GlcN существенно не изменила распределения клеток по фазам цикла. Так, клеток в G_1 -фазе было $19.2 \pm 1.8\%$ без обработки GlcN и $18.6 \pm 2.0\%$ при облучении с GlcN. Клеток в G_2/M -фазах было $67.4 \pm 3.1\%$ без обработки раствором GlcN и $65.6 \pm 1.2\%$ при облучении после обработки. При этом доля клеток с содержанием ДНК $<2c$ при облучении клеток ECV 304 обработанным раствором GlcN увеличивалась до $5.2 \pm 0.4\%$ по сравнению с контролем $1.4 \pm 0.9\%$, но практически не отличалось от раздельной обработки клеток GlcN $5.0 \pm 3.2\%$ и облучением $4.4 \pm 1.9\%$. Коэффициент синергизма для эндотелиоцитов,

рассчитанный как отношение величины доли клеток с содержанием ДНК $<2c$ при сочетанном воздействии к сумме величин при раздельном воздействии, был 0.89. Очевидно, что клетки линии ECV 304 более устойчивы к индуцированной GlcN радиосенсибилизации по сравнению с клетками гепатокарциномы (Hep G2) и карциномы шейки матки (HeLa G63).

На рис. 4 представлены результаты экспериментов по оценке уровня клеток с содержанием ДНК $<2c$ (апоптотически гибнущих клеток) после раздельной и сочетанной обработки клеток 10 ммоль/л GlcN и γ -квантами ^{60}Co в дозе 7 Гр. Из диаграмм видно, что радиочувствительность клеточных линий, оцененная по уровню популяции клеток с содержанием ДНК $<2c$, для клеток линии HeLa G63 и ECV 304 была примерно одинаковой, что подтверждает ранее опубликованные данные, в которых радиочувствительность этих клеточных линий оценивалась нами по уровню радиационно-индуцированных хромосомных повреждений [14]. Сравнительный анализ индукции апоптотической гибели клеток при раздельном и сочетанном воздействии GlcN и γ -квантами ^{60}Co выявил большую чувствительность клеток линии HeLa G63 и Hep G2 к обработке GlcN, чем клетки линии ECV 304. Сочетанное воздействие GlcN и γ -квантов ^{60}Co вдвое и втрое увеличивало эффективность по сравнению с раздельными обработками клеток карциномы линии HeLa G63 и Hep G2. Иными словами, для этих клеток регистрируется существенный синергетический эффект, чего не наблюдается для линии ECV 304. При этом стоит отметить, что GlcN не только увеличивает эффективность облучения γ -квантами ^{60}Co , но сам проявляет селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

Результаты цитометрического анализа подтверждаются морфологическим анализом состава клеточной популяции до и после сочетанного воздействия GlcN и γ -квантами ^{60}Co , представленного на рис. 5. На фотографиях отчетливо видны различия между клетками HeLa G63 и ECV 304. Так, для клеток HeLa G63 регистрируется значительное увеличение апоптотической гибели клеток при сочетанном воздействии через 48 ч после облучения. При этом кроме фрагментации ядерного материала хорошо видна вакуолизация цитоплазмы и нарушения целостности клеточных мембран. Для клеток ECV 304 наглядно проявляется образование микроядер разных размеров, которые при цитометрическом анализе выявляются как клетки с содержанием ДНК $<2c$ и нет фрагментации ядерного материала, характерного для апоптотической гибели клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Регуляция клеточного цикла является важным фактором, модифицирующим радиочувствительность клеток. Показана различная радиочувствительность клеток, облученных в различных фазах клеточного цикла. Меньшую радиочувствительность проявляют клетки в *S*-фазе, большую — в *G*₂/*M* и *G*₁-фазах. Повышенная зависимость опухолевых клеток от глюкозы, в силу их метаболической особенности, позволяет использовать аналоги глюкозы в качестве ингибиторов клеточной пролиферации для селективной синхронизации клеточной популяции. Выявленные нами ранее различия в блокировании пролиферации в двух фазах клеточного цикла двумя аналогами глюкозы — 2-DG и GlcN, а также синергетический эффект при сочетанном воздействии этих агентов, позволили нам предположить, что цитостатический эффект играет важную роль в цитотоксичности ингибиторов гликолиза. GlcN в используемых нами концентрациях нетоксичен для нормальных клеток [6]. Показано, что низкие концентрации GlcN подавляют активность гена *STAT3*, стимулирующего пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [15]. Ионизирующее излучение действует эффективнее на активно пролиферирующие клетки, блокируя в основном переход из *G*₂/*M*-фазы. При сочетанном воздействии GlcN и γ -квантами блокирование клеток происходит сразу в двух точках клеточного цикла: *G*₁ и *G*₂-фазах, преодолеть которые при дефиците АТФ опухолевым клеткам значительно труднее. Второй аналог глюкозы 2-деокси-D-глюкоза (2-DG) блокирует пролиферацию в *G*₂-фазе клеточного цикла [13] и селективно усиливает радиационно-индуцированные повреждения в опухолевых клетках, не влияя на нормальные клетки. При этом радиосенсибилизирующий эффект 2-DG небольшой [16]. По-видимому, цитостатический эффект 2-DG (блокирование клеток в *G*₂/*M*) нивелируется более мощным блокированием клеток в этих же фазах ионизирующим излучением [11]. Кроме того, 2-DG индуцирует модификации радиационного ответа, которые прямо не коррелируют с изменениями уровня АТФ. Очевидно, что взаимосвязь энергетического метаболизма и радиобиологических ответов является очень сложной по своей природе и требует дальнейших исследований. Известно, что глюкозамин также ингибирует N-гликозилирование, которое коррелирует с глюкозамин-индуцированной цитотоксичностью. Предполагается, что глобальное ингибирование N-гликозилирования белков может быть основным механизмом, лежащим в основе мультиплетных биохимических и клеточных эффектов глюкозамина [17]. Результаты систематического анализа молекулярных механизмов воздействия глюкозамина и результаты протеомных

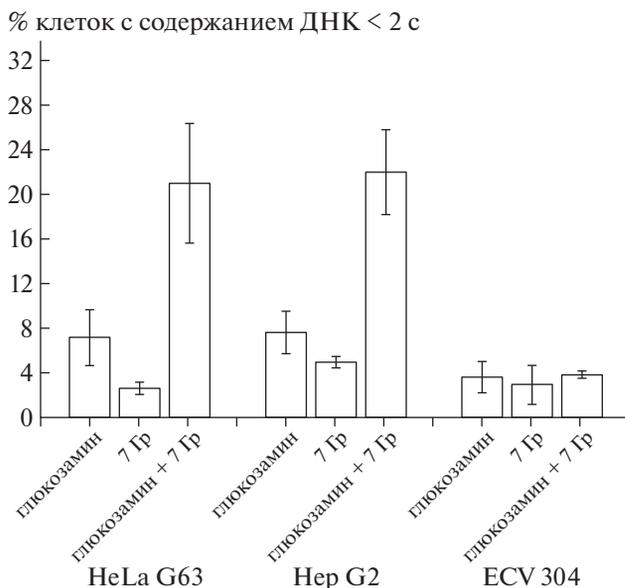


Рис. 4. Уровень клеток с содержанием ДНК <2с после отдельной и сочетанной обработки клеток 10 ммоль/л GlcN и облучения γ -квантами ⁶⁰Co в дозе 7 Гр.

Fig. 4. The level of cells with DNA content <2c after separate and combined treatment of cells with 10 mmol/l GlcN and irradiated with γ -quantum of ⁶⁰Co at a dose of 7 Gy.

исследований эффектов глюкозамина показали, что глюкозамин не взаимодействует ни с геномной ДНК, ни с РНК транскриптома, а продукты биотрансформации глюкозамина являются просто отдельными метаболитами из метаболома. Фармакологические эффекты глюкозамина опосредуются исключительно взаимодействием с определенными белками протеома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обработка клеток ингибитором гликолиза D-глюкозамином нарушает прогрессию клеток по циклу, синхронизируя их в *G*₁-фазе клеточного цикла, что приводит к апоптотической гибели опухолевых клеток (HeLa G 63; Hep G2), и последующее облучение γ -квантами в дозе 7 Гр приводит к значительному увеличению апоптоза по сравнению с отдельным воздействием каждого из этих агентов, чего не наблюдается для опухолевых клеток (ECV 304). Таким образом, очевидна селективно-направленная радиосенсибилизация опухолевых клеток, индуцированная D-глюкозамином. При этом стоит отметить, что глюкозамин не только увеличивает эффективность облучения γ -квантами, но сам проявляет селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Поскольку проявление эффекта регистрируется не сразу, а через 48 ч и позже, то можно предположить, что D-глюкозамин инги-

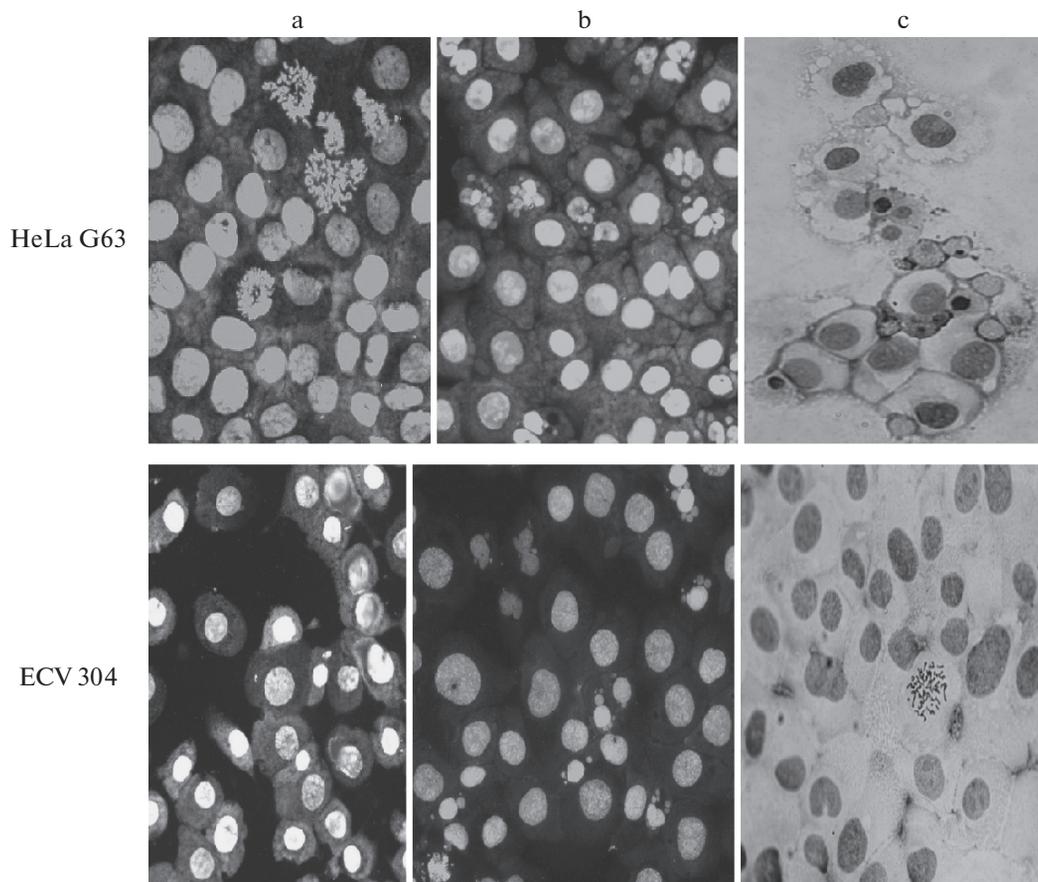


Рис. 5. Морфологические изменения клеток HeLa G 63 (верхняя панель) и ECV 304 (нижняя панель), обработанных 10 ммоль/л раствором GlcNCl и облученных ^{60}Co в дозе 7 Гр: а – без обработки, б – через 48 ч, с – через 72 ч после обработки.

Fig. 5. Morphological changes of HeLa G 63 cells (upper panel) and ECV 304 (lower panel) treated with 10 mmol/l GlcN and irradiated with γ -quantum of ^{60}Co at a dose of 7 Gy: a – without treatment, b – 48 hours after treatment, c – 72 hours after treatment.

бирует АТФ-зависимые пострадиационные репарационные процессы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Oh H.J., Lee J.S., Song D.K., et al.* D-glucosamine inhibits proliferation of human cancer cells through inhibition of p70S6K // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 360. № 4. P. 840–845.
2. *Dalirfardouei R., Kafrimi G., Jamialahmadi K.* Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent // *Life Sci.* 2016. V. 152. P. 21–29.
3. *Quastel J.H., Cantero A.* Inhibition of tumor growth by D-glucosamine // *Nature.* 1953. V. 171. P. 252–254.
4. *Zhang L., Liu W.S., Han B.Q., et al.* Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives // *J. Zhejiang University. Sci. B.* 2006. V. 7. P. 608–614.
5. *Jung C.-W., Jo J.-R., Lee S.-H. et al.* Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 alpha // *Toxicol. In Vitro.* 2012. V. 26. P. 42–50.
6. *Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В. и др.* Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 2019. Т. 63. № 2. С. 41–49. [*Giliano N. Ya., Noskin L. A., Zhurishkina E. V., et al.* The combination of low doses of glucosamine and 2-DG enhances the cytotoxic effect in human tumor cells in culture // *Pathological physiology and experimental therapy.* 2019. V. 63. № 2. P. 41–49. (In Russian)]
7. *Varshney R., Dwarakanath B., Jain V.* Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. V. 81. № 5. P. 397–408.
8. *Wang L.S., Chen S.J., Zhang J.F., et al.* Anti-proliferative potential of Glucosamine in renal cancer cells via inducing cell cycle arrest at G₀/G₁ phase // *BMC Urol.* 2017. V. 17. № 1. P. 1–10.
9. *Dwarkanath B.S., Zolzer F., Chandana S. et al.* Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications

- in energetics and radiation responses of human tumor cell lines // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001. V. 50. № 4. P. 1051–61.
10. Singh D., Banerji A.K., Dwarakanath B.S. et al. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme // *Strahlenther Onkol.* 2005. V. 181. № 8. P. 507–514.
 11. Prasanna V.K., Venkataramana N.K., Dwarakanath B.S., Santhosh V. // *J. Cancer Res. Ther.* 2009. Suppl. 1. P. S44–47.
 12. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge University Press, 2005.
 13. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Коневега Л.В. и др. Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 2014. Т. 58. № 4. [Giliano N.Ya., Bondarev G.N., Konevega L.V., et al. Possible mechanisms for the selective action of glycolysis inhibitors on endotheliocytes and human carcinoma cells // *Pathological physiology and experimental therapy.* 2014. V. 58. № 4. (In Russian)]
 14. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Коневега Л.В. и др. Модификация клеточной радиочувствительности ингибиторами NO-синтазы // *Радиационная биология. Радиэкология.* 2005. Т. 45. № 1. С. 63–70. [Giliano N.Ya., Bondarev G.N., Konevega L.V. et al. Modification of cellular radiosensitivity by NO synthase inhibitors // *Radiation Biology. Radioecology.* 2005. V. 45. № 1. С. 63–70. (In Russian)]
 15. Chesnokov V., Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling // *Cancer Cell Int.* 2009. V. 9. С. 25.
 16. Islamian J.P., Aghaee F., Farajollahi A., et al. Combined Treatment with 2-Deoxy-D-Glucose and Doxorubicin Enhances the in Vitro Efficiency of Breast Cancer Radiotherapy // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015. V. 16. № 18. P. 8431–8438.
 17. Chesnokov V., Gong B., Sun C., Itakura K. Anti-cancer activity of glucosamine through inhibition of N-linked glycosylation // *Cancer Cell Int.* 2014. V. 14. № 45. С. 1–10.

Cytostatic and Radiomodifying Effects of D-Glucosamine on Human Cells in Culture

N. Ya. Giliano^{a, #}, M. M. Dubotolova^a, L. A. Noskin^a, L. V. Konevega^a,
S. I. Stepanov^a, and F. M. Ibatullin^a

^a Petersburg Institute of Nuclear Physics B. P. Konstantinova, Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia

[#]E-mail: gilyano_nj@pnpi.nrcki.ru

The role of the cytostatic factor in the cytotoxic effect of γ -quantum ^{60}Co before and after treatment of cells with a glycolysis inhibitor d-glucosamine was studied on 3 human cell lines. It was shown that treatment of cells with d-glucosamine hydrochloride led to the accumulation of cells in the G_1 phase of the cell cycle. The pre-radiation treatment of cells with d-glucosamine leads to a significant (more than 2-fold) increase in the proportion of apoptotically dying tumor cells (lines HeLa G 63, Hep G2), compared with separate exposure, which is not observed for non-tumor cells (ECV 304). d-glucosamine induced selectively directed radiosensitization of tumor cells. A synergistic effect was recorded 48 hours after irradiation. d-glucosamine is believed to inhibit ATP-dependent post-radiation repair processes.

Keywords: cell cycle, γ -quantum ^{60}Co , apoptosis, d-glucosamine, cytometry, human cell culture

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616-03:611.018.26:599.323.4:57.084:539.1.047

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНГЕННЫХ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ММСК) И СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫХ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ (СВФ) ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2021 г. Ю. Б. Дешевой^{1,*}, В. Г. Лебедев¹, Т. А. Насонова¹, О. А. Добрынина¹,
А. В. Лырщикова¹, Т. А. Астрелина¹, Б. Б. Мороз¹

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

*E-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.

После доработки 03.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Сравнивали в одних и тех же экспериментах эффективность культивированных ММСК и свежeweделенных клеток СВФ жировой ткани при лечении тяжелых местных лучевых поражений. Крыс инбредной линии Wistar-Kyoto подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в области спины в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, сила тока 6.1 мА, фильтр 0.1 мм Al; мощность дозы 20.0 Гр/мин). Облучение приводило к развитию тяжелых поражений кожи с длительно (до 3.5–4.0 мес.) незаживающими лучевыми язвами без критической лучевой нагрузки на подлежащие ткани. Проведено три эксперимента. Трансплантации ММСК проводили во всех опытах двукратно на 27-е и 34-е сутки после облучения. Клетки СВФ в двух опытах вводили двукратно (на 14-е и 26-е сутки или на 27-е и 34-е сутки), а в третьем – трехкратно на 21-е, 35-е и 42-е сутки после облучения. Суспензию ММСК или клеток СВФ в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили под кожу в пять точек вокруг зоны поражения, отступив 5 мм от края язвы. Число трансплантированных ММСК и клеток СВФ при одном введении составляло $1.5\text{--}2.8 \times 10^6$ и $2.5\text{--}2.7 \times 10^6$ соответственно. Клеточная терапия снижала тяжесть течения местных лучевых поражений и ускоряла скорость заживления лучевых язв. Лечебная эффективность ММСК и клеток СВФ в наших экспериментах была примерно одинакова.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, лучевые язвы кожи, клеточная терапия, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани

DOI: 10.31857/S0869803121020065

Местные лучевые поражения кожи и подлежащих тканей являются одним из наиболее распространенных видов радиационных повреждений у человека. Консервативные способы лечения тяжелых местных лучевых поражений, незаживающих хронических лучевых язв часто малоэффективны [1–3]. Поэтому в настоящее время активно разрабатываются и применяются методы клеточной терапии этой патологии. При трансплантации определенных клеток появляется возможность возмещения пораженных клонов специализированных клеток в поврежденных органах и увеличения пула функционирующих клеток, а также активизации в сохранившихся клетках собственного резерва пролиферации и стимуляции регенерации тканей.

Мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) костного мозга применяются в эксперименте и клинике для лечения различных заболеваний, в том числе для терапии лучевых ожогов [4–16]. Эффект ММСК, в основном, связан с их влиянием на трофику пораженной ткани и с выделением целого ряда цитокинов и ростовых факторов, влияющих на регенераторные процессы [4–6, 17].

В настоящее время подкожная жировая ткань является альтернативным (костному мозгу и пуповинной крови) источником получения ММСК для аутологичных трансплантаций в клинике. Это связано с простым способом получения подкожного жира у человека и более высоким (на один-два порядка) содержанием ММСК в строме этой ткани по сравнению с костным мозгом. При

этом функционально ММСК жира не отличается от ММСК костного мозга [17–23]. Поэтому ММСК жировой ткани могут применяться для трансплантаций как в виде популяции культивированных клеток, так и в виде свежeweделенных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ). Предполагается, что клетки СВФ будут даже более эффективными при трансплантациях по сравнению с культивированными ММСК, что может быть обусловлено возможностями кооперативного взаимодействия клеток, входящих в состав СВФ [21].

Целью работы было сравнение в одних и тех же экспериментах лечебной эффективности культивированных мезенхимальных стволовых клеток и свежeweделенных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани для совершенствования метода клеточной терапии тяжелых местных лучевых поражений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Опыты были проведены на крысах самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой тела 250–280 г, полученных из питомника ФИБХ РАН (г. Пушкино). Процедуры и манипуляции с животными проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Предварительно фиксированных крыс подвергали локальному воздействию (подвздошно-поясничная область спины) рентгеновского излучения на установке ЛНК-268 (РАП 100-10) в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, сила тока 6.1 мА, фильтр 0.1 мм Al). Мощность дозы составляла 18.0–20.0 Гр/мин. Поверхность кожи животных облучали на площади 8.5 см². Радиационное воздействие приводило к развитию тяжелых поражений кожи с длительно (до 3.5–4.0 мес.) незаживающими лучевыми язвами, причем без критической лучевой нагрузки на подлежащие ткани [24].

Для получения клеток СВФ подкожную жировую ткань извлекали из брюшной и паховой областей у наркотизированных интактных крыс, которые не использовались в дальнейших опытах. Далее в стерильных условиях жировую ткань механически измельчали ножницами и обрабатывали коллагеназой IA для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток из окружающей ткани. После последующего центрифугирования выделяли клетки СВФ [25, 26], которые сразу же использовали для трансплантации без какой-либо дополнительной обработки или высаживали их в культуральные флаконы для получения ММСК и наработки их *in vitro*.

Проведено морфологическое исследование выделенных клеток стромально-васкулярной фракции, окрашенных по методу Паппенгейма. Процентное соотношение клеток в мазках было следующим – различные популяции стромальных клеток – 31.6% и ядросодержащие клетки крови – 68.4%.

Для получения популяции ММСК клетки СВФ сразу после их выделения суспендировали в полной культуральной среде Iscov' MDM+ Glutamax + Hepes (Sigma, США), содержащей 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“HyClone”, США), гентамицин 50.0 мг/л, амфотерицин Б 2.5 мг/л и высаживали в культуральные пластиковые флаконы (Corning). Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония). Клетки формировали на дне флакона монослой и имели фибробластоподобную морфологию. Для трансплантаций использовали ММСК третьего-четвертого пассажей при 80–90%-ной конfluenceности клеток на дне флакона.

Суспензию ММСК или свежeweделенных клеток СВФ в 1 мл стерильного раствора Хенкса (без ионов Ca и Mg) вводили облученным крысам под кожу в пять точек (по 0.2 мл на точку) вокруг лучевой язвы, отступив 5–7 мм от края очага. Контрольным животным, подвергшимся радиационному воздействию, по той же схеме вводили раствор Хенкса. Во всех опытах в каждой группе было от 8 до 14 крыс. Длительность наблюдения за облученными животными составляла 15 нед.

Считается, что для достижения лечебного эффекта (при местном введении) мелким лабораторным животным достаточно ввести $1.0\text{--}3.0 \times 10^6$ ММСК [27]. В наших различных экспериментах число введенных ММСК отличалось между собой (но в “лечебном” диапазоне), что будет описано в каждом конкретном случае.

Свежeweделенные клетки СВФ трансплантировали во всех опытах в количестве от 2.5×10^6 до 3.0×10^6 на животное. В экспериментах на крысах для получения лечебного эффекта обычно вводят (при различных способах их применения) от $1.0\text{--}4.0 \times 10^6$ клеток СВФ [28–30].

Тяжесть течения лучевого поражения и эффективность клеточной терапии оценивали еженедельно в динамике по изменению клинической картины и скорости заживления лучевых язв. Площади лучевых язв вычисляли по их цифровым фотографиям при помощи компьютерной программы AutoCad 14.

Полученный цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением средней и стандартной ошибки ($M \pm m$). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая картина радиационного поражения кожи развивалась постепенно: через 7–10 дней после облучения наблюдалось развитие сухого дерматита, который к 13–16-м суткам переходил во влажный с десквамацией и микроязвениями эпидермиса. Этот процесс нарастал и к 20–24-м суткам происходило формирование лучевой язвы (в центре зоны локального облучения), покрытой струпом. Морфологические исследования показали, что в этот период некроз охватывает все слои кожи. В дальнейшем наблюдали постепенное заживление язвы, проявляющееся снижением воспалительных явлений в ране, ее краевой эпителизацией, сокращением размера язвы и заживлением с образованием атрофического рубца.

Ранее нами [31] было показано, что ММСК наиболее эффективны при лечении тяжелых лучевых поражений кожи у крыс при условии их двукратной трансплантации в период, когда лучевая язва уже сформирована и в ране начинают преобладать процессы регенерации. Определено, что наиболее оптимальными сроками для трансплантации ММСК были 27-е и 34-е сутки после облучения. Поэтому в наших экспериментах оценивалась лечебная эффективность разных схем введения клеток СВФ (более раннее – 14-е и 26-е сутки, одновременное – 27-е и 34-е сутки, а также более длительное и позднее – трехкратное на 20-е, 34-е и 41-е сутки) по сравнению со стандартной схемой применения ММСК на 27-е и 34-е сутки после облучения.

На рис. 1 представлены результаты эксперимента, где изучали эффекты более раннего двукратного введения клеток СВФ (на 14-е и 26-е сутки) по сравнению со стандартной двукратной трансплантацией ММСК (на 27-е и 34-е сутки). Показано, что введение ММСК стимулировало заживление лучевых язв. Так, в период с 49-х по 105-е сутки после облучения площадь язв у леченых животных была на 21–52% меньше, чем у облученного контроля. Введение клеток СВФ на 14-е и 26-е сутки также оказывало лечебное действие. Динамика заживления лучевых язв у животных с трансплантированными СВФ в целом была близка к таковой при введении ММСК. Однако до 70-х суток она несколько отставала, а к 90-м суткам даже опережала скорость заживления у животных с трансплантированными ММСК.

Лечебная эффективность клеток СВФ при двукратном их введении в оптимальные для проявления эффекта ММСК (27-е и 34-е сутки) сроки была меньше, чем при трансплантации ММСК (рис. 2). Так, в период с 83 по 105 дней площадь лучевых язв у крыс с введением СВФ оказалась на 9–33% больше, чем у животных, леченных ММСК. Причем на 91–99-е сутки эта разница была статистически значимой.

Площадь лучевой язвы, см²

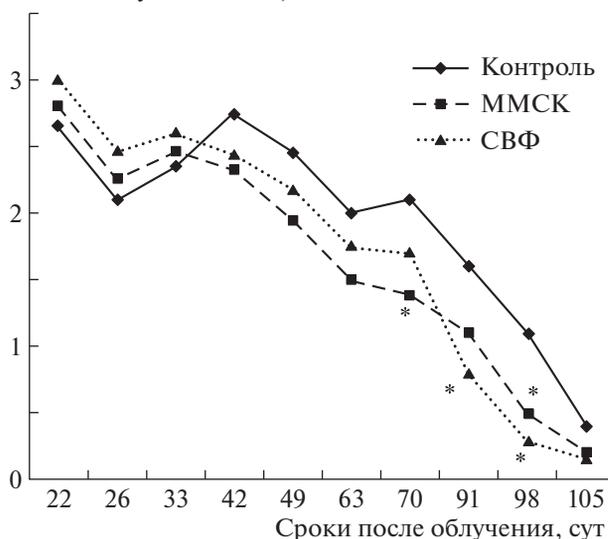


Рис. 1. Динамика заживления лучевых язв кожи у крыс после локального облучения в условиях трансплантации ММСК жировой ткани на 27-е и 34-е сутки или клеток СВФ на 14-е и 26-е сутки после воздействия радиации.

Примечание. В каждой группе по 9 крыс. Введение ММСК: на 27-е сутки ввели 1.9×10^6 клеток, на 34-е сутки – 1.5×10^6 клеток; введение СВФ: на 14-е и 26-е сутки ввели 2.5×10^6 – 3.0×10^6 клеток.

*Значимые различия ($p < 0.05$) по сравнению с облученным контролем.

Fig. 1. Dynamics of healing of skin ulcers in rats after local radiation in the conditions of transplantation of MMSC adipose tissue on the 27th and 34th day or SVF cells on the 14th and 26th after exposure to radiation.

Note. There are 9 rats in each group. Introduction of MMSC: on 27 days introduced 1.9×10^6 cells, on 34 days introduced 1.5×10^6 cells; introduction of SVF: on the 14th and 26th day injected 2.5×10^6 – 3.0×10^6 cells.

* Significant differences ($p < 0.05$) compared to irradiated control.

Более сильную терапевтическую активность клеток СВФ по сравнению с введением ММСК выявили в условиях трехкратной трансплантации на 20-е, 34-е и 41-е сутки после облучения. В период с 63-е по 91-е сутки площадь лучевых язв у этих животных была на 22–39% меньше по сравнению с таковой в группе крыс с трансплантированными ММСК. На 63-е и 91-е сутки эта разница была значимой (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные показывают, что сингенные свежевыведенные клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани при лечении тяжелых местных лучевых поражений могут быть не менее эффективны, чем сингенные культивированные ММСК. Причем, какие клеточные композиции (СВФ или ММСК) более активны

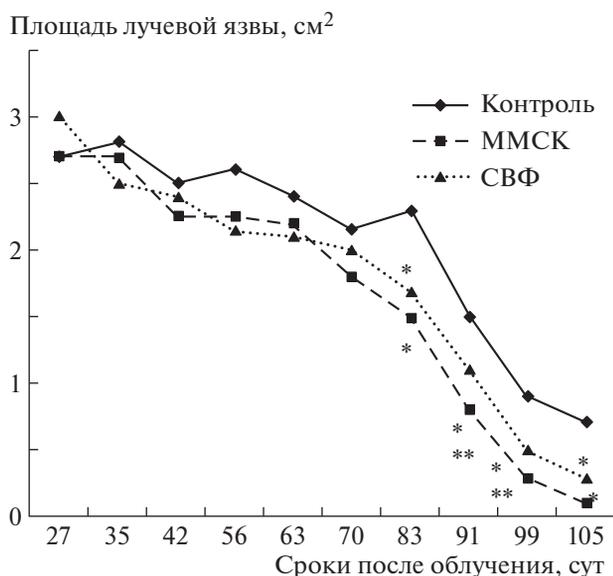


Рис. 2. Изменения площади лучевых язв у крыс после локального воздействия рентгеновского излучения в дозе 110 Гр и трансплантации ММСК или клеток СВФ на 27-е и 34-е сутки после облучения.

Примечание. В каждой группе по 14 животных. Введение ММСК: на 27-е сутки ввели 2.6×10^6 клеток, на 34-е сутки – 2.9×10^6 клеток; введение СВФ: на 27-е и 34-е сутки вводили 2.5×10^6 – 3.0×10^6 клеток.

* Значимые отличия ($p < 0.05$) от облученного контроля; ** значимые отличия ($p < 0.05$) от группы СВФ.

Fig. 2. Changes in the area of radiation ulcers in rats after local exposure to X-rays at a dose of 110 Gr and transplantation of MMSC or SVF cells on the 27th and 34th day after radiation.

Note. There are 14 animals in each group. Introduction of MMSC: on 27 days, 2.6×10^6 cells were introduced and 2.9×10^6 cells were injected for 34 days; introduction of SVF: on 27 and 34 days injected 2.5×10^6 – 3.0×10^6 cells.

* Significant differences ($p < 0.05$) from irradiated control; ** significant differences ($p < 0.05$) from the SVF group.

при данной патологии, сказать трудно. Наши результаты близки к данным, полученным в работах [32, 33], где в аутологических (для клеток СВФ) условиях сравнивали лечебную эффективность клеток аутологических СВФ и ММСК (аутологических или аллогенных) при различной патологии (не лучевой природы), и были сделаны выводы об их близкой эффективности.

Результаты наших исследований подтверждают данные о возможности применения свежесделанных клеток СВФ и культивированных ММСК жировой ткани при лечении лучевых поражений кожи [34–39].

Для выяснения возможных механизмов лечебного действия клеток СВФ и культивированных ММСК на лучевые поражения кожи необходимо охарактеризовать их клеточный состав и функциональные возможности.

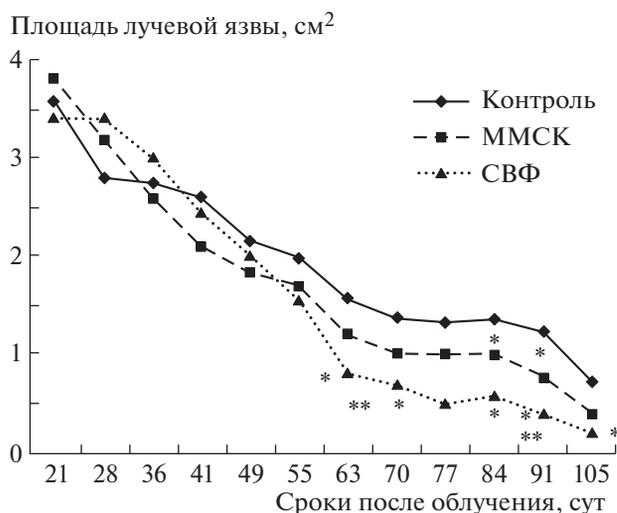


Рис. 3. Изменения площади лучевых язв кожи у крыс после трехкратного введения клеток СВФ на 21-е, 35-е и 42-е сутки или двукратной трансплантации ММСК на 27-е и 34-е сутки после локального воздействия рентгеновского излучения в дозе 110 Гр.

Примечание. В каждой группе по 8 крыс. Введение ММСК: на 27-е сутки ввели 1.8×10^6 клеток, на 34-е сутки – 1.9×10^6 клеток. Введение СВФ: на 21-е, 35-е и 42-е сутки вводили по 2.5×10^6 – 3.0×10^6 клеток. * Значимые отличия ($p < 0.05$) от облученного контроля; ** значимые различия ($p < 0.05$) от группы ММСК.

Fig. 3. Changes in the area of skin ulcers in rats after the three-fold introduction of SVF cells on 21, 35 and 42 days after local X-ray radiation at a dose of 110 Gy.

Note. There are eight rats in each group. Introduction of MMSC – on 27 days introduced 1.8×10^6 cells, on 34 days – introduced 1.9×10^6 cells. Introduction of SVF – on 21, 35 and 42 days injected on 2.5×10^6 – 3.0×10^6 cells.

* Significant difference ($p < 0.05$) from irradiated control; ** reliable differences ($p < 0.05$) from the MMSC group.

В состав свежесделанной СВФ человека входят клетки кроветворного ряда: среди них стволовые и клетки предшественники – 0.1%, гранулоциты 10–15%, лимфоциты 10–15%, моноциты 5–15%. Кроме клеток крови в состав СВФ входят 10–20% эндотелиальных клеток и их предшественников, 15–30% различных популяций стромальных клеток и 10–20% перицитов. Считается, что число ММСК (по тесту – КОЕ-Ф) среди клеток СВФ примерно 1–10% [20, 21].

В процессе культивирования популяция ММСК становится близкой по составу и несет на своей поверхности маркеры стромальных клеток – CD13, CD73 и CD90 (при снижении экспрессии CD34). Тем не менее, считается, что функционально эти клетки неоднородны и содержат не только стволовые и коммитированные клетки предшественники, но и более дифференцированные стромальные клетки. Количество

именно стволовых клеток (по тесту КОЕ-Ф) составляет лишь 5–30% [18–23].

Несмотря на различие в клеточном составе культивируемых ММСК и клеток СВФ, они способны действовать на одни и те же процессы в пораженной радиацией коже. Клетки после трансплантации модулируют иммунные процессы и снижают воспалительные явления в ране [18–23]. Способствуя неангиогенезу, они улучшают трофику пораженных тканей [18–23, 40]. Трансплантированные ММСК дифференцируются в фибробласты [40], которые активно участвуют в регенераторных процессах. Все это приводит к активизации заживления лучевых язв и их эпителизации. Причем задействуются близкие механизмы влияния: через выработку целого ряда цитокинов и ростовых факторов (IL1, IL6, IL8, IL10, PGE2 TGF- β , HGF, VEGF, KGF, IGF, PDGF-AA, EGF, BDNF, Angiopoietin 1 и др.). Кроме того, имеет место возмещение погибших клеток за счет как самих трансплантированных клеток, так и их дифференцированных потомков [18–23, 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что как сингенные культивируемые ММСК, так и сингенные свежесыведенные клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани могут с успехом применяться при лечении тяжелых местных лучевых поражений. Лечебная эффективность ММСК и клеток СВФ в наших экспериментах была примерно одинакова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения / Под ред. Л.А. Ильина. Т. 2. М.: ИздАТ, 2001. 432 с. [Radiation medicine: A guide for medical researchers and health care organizers / Ed. L.A. Ilyin. V. 2. M.: Izdat, 2001. 432 p. (In Russian)]
2. Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Нугис В.Ю. и др. Местные лучевые поражения кожи человека: возможности биологической индикации дозы (аналитический обзор) // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2005. Т. 50. № 1. С. 37–47. [Bushmanov A.J., Nadezhina N.M., Nugis V.Yu. et al. Local radiation damage of human skin: possible biological indication of dose (analytical review) // Medical radiology and radiation safety. 2005. V. 50. № 1. P. 37–47. (In Russian)]
3. Надежина Н.М., Филин С.В., Сачков А.В. и др. Острые местные лучевые поражения и их последствия (нештатная ситуация при дефектоскопических работах) // Медицина труда и пром. экология. 2004. № 3. С. 40–43. [Nadezhina N.M., Filin S.V., Sachkov A.V. et al. Acute local radiation and their consequences (contingency in flaw inspection) / Occupational Medicine and Industrial Ecology. 2004. № 3. P. 40–43. (In Russian)]
4. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // Arthritis Res. Ther. 2003. V. 5. № 1. P. 32–45.
5. Онищенко Н.А. Клеточные технологии и современная медицина // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2004. № 4. С. 2–11. [Onishchenko N.A. Cellular technology and modern medicine // Pathology Physiology and Experimental Therapy. 2004. № 4. P. 2–11. (In Russian)]
6. Isakson M., de Blacam C., Whelan D. et al. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. Review article // Hunda-wi publishing corporation. Stem Cells International. V. 2015. Article ID 831095, 12 p. <https://doi.org/10.1155/2015/831095>
7. Brower J., Blumberg S., Carroll E. et al. Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds // Adv. Skin Wound Care. 2011. Nov. V. 24. № 11. P. 524–532.
8. Мороз Б.Б., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г. и др. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 6. С. 688–693. [Moroz B.B., Onischenko N.A., Lebedev V.G. et al. Influence of multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow on process the local radiation injury in rats after local β -irradiation // Radiation Biology. Radioecology. 2009. V. 49. № 6. P. 688–693. (In Russian)]
9. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Надежина Н.М. и др. Трансплантация мезенхимальных клеток при лечении лучевых поражений кожи // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2011. № 1. С. 2–7. [Kotenko K.V., Moroz B.B., Nadezhina N.M. et al. Mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of radiation skin lesions // Pathological physiology and experimental therapy. 2011. № 1. P. 2–7. (In Russian)]
10. Котенко К.В., Еремин И.И., Мороз Б.Б. и др. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: Опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 2. С. 97–102. [Kotenko K.V., Eremin I.I., Moroz B.B. et al. Cell technologies in the treatment of radiation burns: experience Burnasyan Federal Medical Biophysical Centre // Cell transplantology and tissue engineering. 2012. V. 7. P. 97–102. (In Russian)]
11. Akito S., Akino K., Hiruno A. et al. Proposed regeneration therapy for cutaneous radiation injuries // Acta Med. Nagasak. 2006. V. 51. № 4. P. 50–55.
12. François S., Bensidhoum M., Mouiseddine M. et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage // Stem Cells. 2006. V. 24. № 4. P. 1020–1029.
13. François S., Mouiseddine M., Mathieu N. et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model // Ann. Hematol. 2007. V. 86. № 1. P. 1–8.
14. Mehannil S.S., Ibrahim N.F., Hassan A.R. et al. New Approach of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Amniotic Epithelial Cells Ap-

- plications in Accelerating Wound Healing of Irradiated Albino Rat // *Int. J. Stem Cells*. 2013. V. 6. № 1. P. 45–54.
15. *Lataillade J.J., Doucet C., Bey E. et al.* New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy // *Regen. Med.* 2007. V. 2. P. 785–794.
 16. *Коноплянников А.Г., Колесникова А.И., Саенко А.С. и др.* Кондиционная среда, обладающая лечебным эффектом: Патент РФ № 2292212, январь, 2007. [*Konopljannikov A.G., Kolesnikova A.I., Saenko A.S. et al.* Conditions medium with therapeutic effect. Patent RU № 2292212, January 2007. (In Russian)]
 17. *Schafer R., Spohn G., Baer P.* Mesenchymal stem/stromal cell in regenerative medicine: can preconditioning strategies improve therapeutic efficacy? // *Transfusion medicine and hemotherapy*. 2016. V. 43. P. 256–267.
 18. *Терских В.В., Киселева Е.В.* Биологические особенности и терапевтический потенциал стромальных клеток жировой ткани. Обзор // *Пластическая хирургия и косметология*. 2010. № 4. С. 613–621. [*Terskikh V.V., Kiseleva E.V.* Biological peculiarities and therapeutic potential of stromal cells of adipose tissue. Review // *Plastic surgery and cosmetology*. 2010. V. 4. P. 613–621. (In Russian)]
 19. *Gir Ph., Oni G., Brown S.A. et al.* Human adipose stem cells: Current clinical applications // *Plast. Reconst. surg.* 2012; 129:1277–1290.
 20. *Веремеев А.В., Болгарин Р.Н., Петкова М.А. и др.* Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины // *Гены & Клетки*. 2016. Т. 11. № 1. С. 35–42. [*Veremeyev A.V., Bulgarin R.N., Petkova M.A. et al.* Stromal-vascular fraction of adipose tissue as an alternative source of cellular material for regenerative medicine // *Genes & Cells*. 2016. T. 11. № 1. P. 35–42. (In Russian)]
 21. *Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT) // *Cytotherapy*. 2013. V. 15. P. 641–648.
 22. *Bora P., Majumdar A.* Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review and translation // *Stem Cell Res. Therap.* 2017. V. 8. P. 145. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>
 23. *Seo Y., Shin T.H., Kim H.S.* Current strategies to enhance adipose stem cell function: an update // *Int. J. Molec. Sci.* 2019. V. 20. P. 3827. <https://doi.org/10.3390/ijms>
 24. *Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А. и др.* Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения // *Патол. физиология и эксперим. терапия*. 2013. № 4. С. 121–123. [*Kotenko K.V., Moroz B.B., Nasonova T.A. et al.* Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after x-rays // *Pathological physiology and experimental therapy*. 2013. № 4. P. 121–123. (In Russian)]
 25. *Bognest A.C., Shandadfar A., Brinchmann J.E. et al.* Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue // *Meth. Mol. Biol.* 2006. V. 325. P. 35–46.
 26. *Bunnell B.A., Flaot M., Gagliardi Ch. et al.* Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation // *Methods*. 2008. V. 45. № 2. P. 115–120.
 27. *Isakson M., de Blacam C., Whelan D. et al.* Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. Review article // *Hundawi publishing corporation. Stem Cells International*. V. 2015. Article ID 831095. 12 p. <https://doi.org/10.1155/2015/831095>
 28. *Benfar M., Javanmardi S., Sarrafzadeh-Rezaei F.* Comparative study on functional effects allotransplantation of bone marrow stromal cells and adipose derived stromal vascular fraction on tendon repair: a biomechanical study in rabbits // *Cell J.* 2014. Fall. V. 16. № 3. P. 263–270.
 29. *Semon J.A., Maness C., Zhang X.* Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis // *Stem Cell Res. Ther.* 2014. V. 5. № 1. P. 2.
 30. *Zhou L., Song K., Xu L. et al.* Protective effects of uncultured adipose-derived stromal vascular fraction on testicular injury induced by torsion-detorsion in rats // *Stem Cells Translat. Med.* 2019. V. 8. P. 383–391.
 31. *Дешевой Ю.Б., Насонова Т.А., Добрынина О.А. и др.* Опыт применения сингенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) жировой ткани для лечения тяжелых радиационных поражений кожи в различные сроки после облучения в эксперименте // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020. Т. 60. № 1. С. 24–31. [*Deshevoi Yu.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A. et al.* Experience of application of syngeneic multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) adipose tissue for treatment of severe radiation skin lesions at various intervals after exposure in the experiment // *Radiation Biology. Radioecology*. 2020. V. 60. № 1. P. 24–31. (In Russian)]
 32. *Marx C., Silveira M.D., Selbach I. et al.* Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. // *Stem Cells Int.* 2014. V. 2014. Article ID 391274. 6 p.
 33. *You D., Jang M.J., Kim B.H. et al.* Comparative study of autologous stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells for erectile function recovery in rat model of cavernous nerve injury // *Stem Cells Translat. Med.* 2015. V. 4. P. 351–358.
 34. *Rigotti G., Marchi A., Galie M. et al.* Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose tissue-derived adult stem cells // *Plast. Reconstr. Surg.* 2007. V. 119. № 5. P. 1409–1422.
 35. *Riccodono D., Agay D., Scherthan H. et al.* Application of adipose-derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome // *Health Phys.* 2012. V. 103. № 2. P. 120–126.
 36. *Akita S., Yoshimoto H., Ohtsuru A. et al.* Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries // *Radiat. Prot. Dosim.* 2012. V. 151. № 4. P. 656–660.

37. Forcheron F., Agay D., Scherthan H. et al. Autologous adipose-derived stem cells favour healing in minipig model treatment of cutaneous radiation syndrome // PLOS One. 2012. V. 7. № 2. e 31694.
38. Sheng-Ping H., Chun-Hsiang H., Jia-Fwu Sh. et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model // J. Biomed. Sci. 2013. V. 20. № 1. P. 51–61.
39. Lipi Shukla, Wayne A. Morrison, Ramin Shayan. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier // Front. Surg. Reconstruct. Plastic Surg. January 2015. V. 2. Article 1. P. 1–12.
40. Yaojiong Wu M.D., Liwen Cheng, Paul G. Scott et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis // Stem Cells. 2007. V. 25. Issue 10. P. 2648–2659.

Comparative Effectiveness of Singful Cultivated Mesenchymal Stem Cells (MMSC) and Freshly Isolated Cells of Stromal-Vascular Fraction (SVF) of Fat Tissue in the Treatment of Severe Local Radiation Lesions in the Experiment

Yu. B. Deshevoi^{a,#}, V. G. Lebedev^a, T. A. Nasonova^a, O. A. Dobrynina^a, A. V. Lyrshhikova^a, T. A. Astrelina^a, and B. B. Moroz^a

^a Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

[#]E-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

In the same experiments, the effectiveness of cultivated MMSC and freshly allocated SVF cells of adipose tissue in the treatment of severe local radiation lesions was compared. The Wistar-Kyoto inbred line was exposed to local X-ray radiation in the back at 110 Gy (30 kV tube voltage, amperage 6.1 mA, filter 0.1 mm Al), dose rate of 20.0 Gy/min. Radiation led to the development of severe skin lesions with long-term (up to 3.5–4 months) non-healing radiation ulcers without critical radiation load on the tissue in question. Three experiments have been carried out. MMSC transplants were carried out in all experiments twice on 27 and 34 days after radiation. SVF cells in two experiments were injected twice (on 14 and 26 days or on 27 and 34 days), and in the 3rd three times on 21, 35 and 42 days after radiation. The suspension of MMSC or SVF cells in 1 ml of Hensks sterile solution was injected under the skin at 5 points around the lesion zone, retreating 5 mm from the edge of the ulcer. The number of transplanted cells in one introduction was: MMSC – $1.5\text{--}2.8 \times 10^6$ and SVF – $2.5\text{--}2.7 \times 10^6$. Cell therapy reduced the severity of local radiation lesions and accelerated the healing rate of radiation ulcers. The therapeutic effectiveness of MMSC and SVF cells in our experiments was roughly the same.

Keywords: X-ray radiation, radiation skin ulcers, cell transplantation, mesenchymal stem cells, cells of stromal-vascular fraction of fat tissue

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 615.2:577.1:599.323.4:591.441:57.084:539.1.047

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ “РЕКСОД” НА ЧИСЛО КОЕ_С У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2021 г. А. В. Аклеев^{1,2}, И. А. Шапошникова^{1,*}, И. В. Чурилова³,
А. Н. Гребенюк^{3,4}, Е. А. Пряхин¹

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

³ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shaposhnikova@lenta.ru

Поступила в редакцию 10.08.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Исследована противолучевая эффективность препарата Рексод® (ГосНИИ ОЧБ ФМБА России), содержащего рекомбинантную супероксиддисмутазу (СОД) человека, по критерию сохранности и пролиферативной активности кроветворных стволовых клеток у мышей самцов инбредной линии С57В1/6 SPF категории после острого внешнего γ -облучения. Животных подвергали общему γ -облучению на установке ИГУР-1М с источником ¹³⁷Cs в дозах от 3.0 до 7.5 Гр при мощности дозы 0.78 Гр/мин. Рекомбинантную СОД вводили внутривентриально однократно в дозе 180 мг/кг (в объеме 1 мл) за 15 мин до облучения. Оценку противолучевых свойств СОД проводили по количеству колониеобразующих единиц в эндотесте (КОЕс), ядросодержащих клеток в костном мозге и тимусе, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови, динамике массы тимуса и селезенки. Показано, что применение СОД позволяет повысить сохранность КОЕс после острого γ -облучения мышей в дозе 4 Гр. Отмеченные изменения зависимости числа КОЕс и других гематологических показателей после введения СОД могут свидетельствовать о стимуляции гемопоэза в селезенке. Выявленное стимулирующее действие СОД на эритропоэз и количество ядерных клеток в тимусе как у облученных, так и у необлученных животных открывает новые перспективы применения препарата и требует дальнейшего изучения механизмов выявленных эффектов.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, супероксиддисмутазы, гемопоэтические стволовые клетки, КОЕс, выживаемость

DOI: 10.31857/S086980312102003X

К настоящему времени получено много доказательств, что антиоксиданты способны модифицировать реакции гемопоэза на радиационное воздействие. Радиозащитный эффект антиоксидантов был установлен в экспериментальных исследованиях *in vitro*, *in vivo* и в клинических условиях [1]. Механизм противолучевого действия антиоксидантов прямо и косвенно связан с ингибированием цитотоксических и мутагенных эффектов активных радикалов посредством их элиминации, угнетения перекисного окисления липидов, активации ферментов репарации повреждений, снижения активности NO-синтазы [2]. Показано, что высокая радиочувствительность некоторых клеточных линий обусловлена нарушением антиоксидантной активности [3].

Хорошо известно, что ключевыми ферментами антиоксидантной защиты клеток являются марганецзависимая и медь-цинкзависимая супероксиддисмутазы (СОД), которые контролируют окислительные процессы с участием свободных радикалов кислорода и азота, образование продуктов перекисаии липидов, повышенный уровень которых наблюдается после радиационного воздействия и при многих патологических состояниях, сопряженных с окислительным стрессом [1, 4, 5]. Хотя показано, что СОД может приводить к повышению выживаемости кроветворных стволовых клеток (КСК) человека и к повышению выживаемости животных при костномозговой форме острого лучевого синдрома [6], механизмы ее действия на гемопоэз остаются неясными. В настоящей работе было исследовано противо-

лучевое действие рекомбинантной человеческой СОД препарата Рексод[®], созданной во ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерально-го медико-биологического агентства (ГосНИИ ОЧБ ФМБА России). Основным действующим веществом препарата Рексод[®], который обладает антиоксидантным, антицитотоксическим и противовоспалительным действием (РУ ЛП-004754-260318), является рекомбинантная СОД человека, получаемая по генно-инженерной технологии с использованием в качестве продуцента культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, штамм Y21341 [7].

Целью работы была оценка влияния препарата Рексод[®] на гемопозез мышей, включая анализ сохранности и пролиферативной активности кровяных стволовых клеток после острого внешнего γ -облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на кондиционных половозрелых мышцах самцах инбредной линии C57Bl/6 SPF категории (питомник ИЦИГ, Новосибирск) в возрасте 2.0–2.5 мес. с массой тела 20–23 г. Условия содержания и кормления животных осуществлялись в соответствии с приказом № 742 от 13.11.1984 “Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” и приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”. При проведении исследований соблюдались правила гуманного обращения с экспериментальными животными в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, утвержденными приказом Минздрава СССР (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 775) и стандартами Этического комитета ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины (УНПЦ РМ).

Лабораторные животные содержались в оптимальных для данного вида условиях. Температура воздуха в помещении +22°C, влажность – 50–60%. Длина светового дня регулировалась с помощью искусственного освещения и составляла 12 ч. Животных содержали на стандартном рационе с неограниченной подачей питьевой воды.

Первоначально была проведена оценка зависимости количества КОЕс (колониеобразующие единицы в селезенке, эндотелии) [8] от дозы внешнего γ -облучения для выбора дозы, используемой в эндотесте с целью определения радиозащитного действия СОД. Процедуру метода эндотеста проводили в точном соответствии с модификацией, предложенной А.Е. Переверзевым [9].

Было сформировано 15 групп по восемь животных в каждой. Определение выживаемости КОЕс оценивали после острого тотального γ -облучения мышей в дозах 3.0; 3.25; 3.5; 3.75; 4.0; 4.5; 5.0; 5.25; 5.5; 5.75; 6.0; 6.25; 6.5; 7.0; 7.5 Гр. Облучение животных проводили на установке ИГУР-1М, которая содержит четыре источника ¹³⁷Cs. Мощность дозы γ -излучения установки составляет 0.78 Гр/мин, неравномерность γ -поля в рабочем пространстве – не более 5%. Определение количества КОЕс в селезенке проводили на 9-е сутки после острого тотального γ -облучения.

Для оценки радиозащитных свойств рекомбинантой человеческой СОД использовали препарат Рексод[®], раствор для внутривенного введения 3.2 млн ЕД (РУ ЛП-004754-260318), производства ГосНИИ ОЧБ ФМБА России. Оценка радиозащитных свойств препарата проводили по показателям, характеризующим состояние кроветворения (количество КОЕс, ядросодержащих клеток (ЯСК) в костном мозге, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови) и лимфоидных органов – тимуса (масса и количество клеток в органе) и селезенки (масса). Оценку радиозащитного действия препарата Рексод[®] проводили в двух независимых экспериментах.

В первой серии экспериментов было сформировано две группы по 20 животных в каждой. Мышам опытной группы внутривенно (в/в) однократно вводили препарат Рексод[®] в объеме 1 мл (в дозе 180 мг/кг) за 15 мин до облучения в дозе 4 Гр, мышам контрольной группы – внутривенно вводили растворитель (физиологический раствор) в те же сроки и в том же объеме за 15 мин до облучения.

На 9-е сутки после острого тотального γ -облучения проводили эвтаназию, вскрытие, макроскопическое исследование внутренних органов, измерение массы селезенки и тимуса, оценку количества КОЕс в селезенке, ЯСК в костном мозге и тимусе, количества клеток периферической крови.

Во второй серии экспериментов было сформировано четыре группы животных:

- 1-я группа – 20 самцов мышей, которым за 15 мин до облучения в дозе 4 Гр проводилось в/в введение 1 мл препарата Рексод[®] (в дозе 180 мг/кг);
- 2-я группа (контроль) – 20 самцов мышей, которым за 15 мин до облучения в дозе 4 Гр проводилось в/в введение 1 мл физиологического раствора;
- 3-я группа – 11 самцов мышей, которым проводилось в/в введение 1 мл препарата Рексод[®] (в дозе 180 мг/кг) (необлученные животные);
- 4-я группа (контроль) – 11 самцов мышей, которым проводилось в/в введение 1 мл физиологического раствора (необлученные животные).

На 9-е сутки после острого тотального γ -облучения проводили эвтаназию, вскрытие, макро-скопическое исследование внутренних органов, измерение массы селезенки и тимуса, количества КОЕс в селезенке, количества ЯСК в костном мозге и тимусе, количества клеток периферической крови.

Анализ полученных результатов осуществляли с помощью общепринятых методов статистики [10]: рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартную ошибку, для оценки взаимосвязи исследованных показателей использовали корреляционный и регрессионный анализ. При анализе распределения показателей с помощью критерия Колмогорова–Смирнова было показано, что они статистически значимо не отличались от нормального, поэтому применяли параметрические методы анализа. Сравнение средних проводили с помощью t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми принимали отличия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проводили оценку зависимости количества сохранивших жизнеспособность КОЕс у самцов мышей C57B1/6 от дозы внешнего общего γ -облучения. Результаты подсчета КОЕс в разных дозовых группах мышей представлены на рис. 1. Видно, что выживаемость КОЕс хорошо описывалась экспоненциальной функцией ($R^2 = 0.93$; $F = 190.95$; $p = 6.15 \times 10^{-10}$). Расчетное значение D_0 для КОЕс у самцов мышей C57B1/6 составило 0.73 Гр. Для дальнейшего тестирования радиозащитного действия препарата Рексод® была выбрана доза 4 Гр.

Результаты первой серии экспериментов по оценке радиозащитного действия препарата Рексод®, полученные в исследованиях с острым однократным облучением мышей линии C57B1/6, представлены в табл. 1. Количество клеток в периферической крови у мышей опытной и кон-

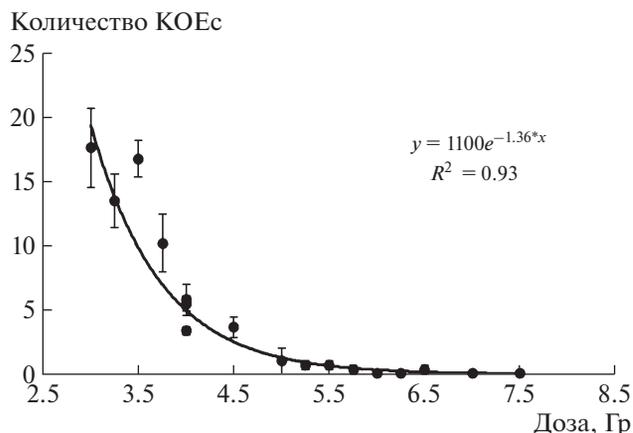


Рис. 1. Количество эндokolоний в селезенке мышей C57B1/6 при облучении в различных дозах, КОЕс/селезенку.

Fig. 1. The number of endocolonies in the spleen of C57B1/6 mice under irradiation at different doses, CFU/spleen.

трольной групп статистически значимо не отличалось, хотя у животных опытной группы отмечалось более высокое содержание эритроцитов и лейкоцитов.

Масса тимуса у животных опытной группы была статистически значимо ниже, чем у животных контрольной группы и составляла 22.35 ± 0.50 мг ($p = 0.05$) при 24.10 ± 0.68 мг в контроле. Количество ядросодержащих клеток в тимусе животных опытной группы значимо не отличалось относительно контроля (2.02 ± 0.08 млн ЯСК/мг) и составило 1.81 ± 0.10 млн ЯСК/мг.

Статистически значимые отличия наблюдались при оценке количества КОЕс у животных опытных и контрольных групп. Количество КОЕс у животных, которым вводили препарат Рексод® за 15 мин до облучения, было в 1.5 раза выше по сравнению с контролем и составило 8.05 ± 0.90

Таблица 1. Результаты первой серии экспериментов по оценке радиозащитного действия СОД при остром γ -облучении мышей линии C57B1/6 в дозе 4 Гр

Table 1. Results of the first series of experiments to assess the radioprotective effect of SOD during acute γ -irradiation of C57B1/6 mice at 4 Gy

Группы	Масса животных, г	Масса селезенки, мг	КОЕс	ЯСК в костном мозге, млн/бедро	Масса тимуса, мг	ЯСК в тимусе, млн/мг	Эритроциты, млн/мкл	Лейкоциты, млн/мл
Опыт СОД + 4 Гр	22.42 ± 0.30	33.45 ± 1.50	8.05 ± 0.90 $p = 0.02$	18.70 ± 0.60	22.35 ± 0.50 $p = 0.05$	1.81 ± 0.10	2.35 ± 0.10	2.53 ± 0.10
Контроль Физиол. р-р + 4 Гр	22.40 ± 0.20	32.90 ± 1.80	5.45 ± 0.60	19.36 ± 0.70	24.10 ± 0.68	2.02 ± 0.08	2.11 ± 0.14	2.21 ± 0.13

Таблица 2. Результаты второй серии экспериментов по оценке радиозащитного действия СОД при остром γ -облучении мышей линии C57B1/6 в дозе 4 ГрTable 2. Results of the second series of experiments to assess radioprotective effect of SOD during acute γ -irradiation of C57B1/6 mice at 4 Gy

Группы	Масса животных, г	Масса селезенки, мг	КОЕс	ЯСК в костном мозге, млн/бедро	Масса тимуса, мг	ЯСК в тимусе, млн/мг	Эритроциты, млн/мкл	Лейкоциты, млн/мл
СОД + 4 Гр	23.39 \pm 0.30	32.50 \pm 1.30	10.30 \pm 0.98 <i>p</i> = 0.02	18.19 \pm 0.70	27.55 \pm 1.0	1.94 \pm 0.10 <i>p</i> = 0.0001	5.01 \pm 0.20 <i>p</i> = 0.0001	2.25 \pm 0.10 <i>p</i> = 0.02
Физиол. р-р + 4 Гр	23.25 \pm 0.17	31.15 \pm 0.66	7.35 \pm 0.70	18.13 \pm 0.89	26.30 \pm 1.01	1.47 \pm 0.05	3.44 \pm 0.16	1.88 \pm 0.12
СОД	22.63 \pm 0.60	51.50 \pm 2.40	–	21.01 \pm 0.80	27.17 \pm 2.30 <i>p</i> = 0.05	1.60 \pm 0.10 <i>p</i> = 0.01	6.31 \pm 0.20 <i>p</i> = 0.0001	11.06 \pm 0.70
Физиол. р-р	22.05 \pm 0.40	48.27 \pm 1.40	–	21.79 \pm 1.20	21.64 \pm 1.40	0.91 \pm 0.20	3.96 \pm 0.20	11.51 \pm 1.30

Примечание. Статистическая значимость различий представлена для групп “СОД + 4 Гр” и “Физиол. р-р + 4 Гр”, “СОД” и “Физиол. р-р”.

(*p* = 0.02). В контрольной группе показатель составил 5.45 ± 0.60 .

Результаты второй серии экспериментов по оценке радиозащитного действия препарата Рексод[®], полученные в исследованиях с острым однократным облучением мышей линии C57B1/6, представлены в табл. 2. При применении Рексод[®] был воспроизведен эффект повышения числа стволовых клеток. Количество КОЕс у животных, которым вводили препарат за 15 мин до облучения, было на 40% выше (*p* = 0.02) по сравнению с контролем и составило 10.30 ± 0.98 . В контрольной группе этот показатель был равен 7.35 ± 0.70 .

Количество эритроцитов у облученных животных, которые получили Рексод[®], было в 1.5 раза выше (*p* = 0.0001), чем в контрольной облученной группе и составляло 5.01 ± 0.20 млн/мкл. У необлученных мышей введение препарата также приводило к статистически значимому увеличению количества эритроцитов в периферической крови по сравнению с необлученным контролем (*p* = 0.0001).

В группе, где животные получали препарат Рексод[®] до облучения, среднее содержание лейкоцитов было равно 2.25 ± 0.10 млн/мл, что было статистически значимо выше (*p* = 0.02) данного показателя у облученного контроля – 1.88 ± 0.12 млн/мл.

Во второй серии экспериментов масса тимуса у облученных животных первой и второй групп не имела достоверных отличий. Однако у необлученных мышей, которые получили Рексод[®], масса тимуса составила 27.17 ± 2.30 мг и была статистически значимо выше (*p* = 0.05) показателя у необлученного контроля – 21.64 ± 1.40 мг.

Количество ядросодержащих клеток в тимусе в экспериментальных группах, где животные по-

лучали Рексод[®], было статистически значимо выше показателей облученных и необлученных животных.

Для оценки влияния СОД на реакцию гемопоэза после общего острого облучения методами регрессионного и корреляционного анализа исследовали взаимосвязи изученных показателей с количеством КОЕс у облученных мышей, получавших Рексод[®], и в группе облученного контроля.

В группе облученного контроля и в группе, где мыши получали Рексод[®], была отмечена положительная связь между количеством КОЕс и массой селезенки (рис. 2). Зависимость массы селезенки от количества КОЕс в группе контроля хорошо описывалась линейной функцией ($R^2 = 0.50$; $F = 38.57$; $p < 0.001$). В группе, где облученные животные получали Рексод[®], зависимость имела аналогичный характер, но была более выражена ($R^2 = 0.91$; $F = 370.35$; $p < 0.001$).

Корреляционный анализ не позволил отметить статистически значимой связи между количеством КОЕс и количеством ЯСК в костном мозге мышей в группе облученного контроля (рис. 3, а). Однако у облученных животных, которым вводили Рексод[®], была зарегистрирована статистически значимая обратная связь между количеством КОЕс и количеством ЯСК в костном мозге (рис. 3, б). У мышей из группы облученного контроля не было выявлено статистически значимой связи между количеством КОЕс и лейкоцитов в периферической крови (рис. 4, а), тогда как у облученных мышей, получивших Рексод[®], была зарегистрирована положительная статистически значимая связь между этими показателями (рис. 4, б).

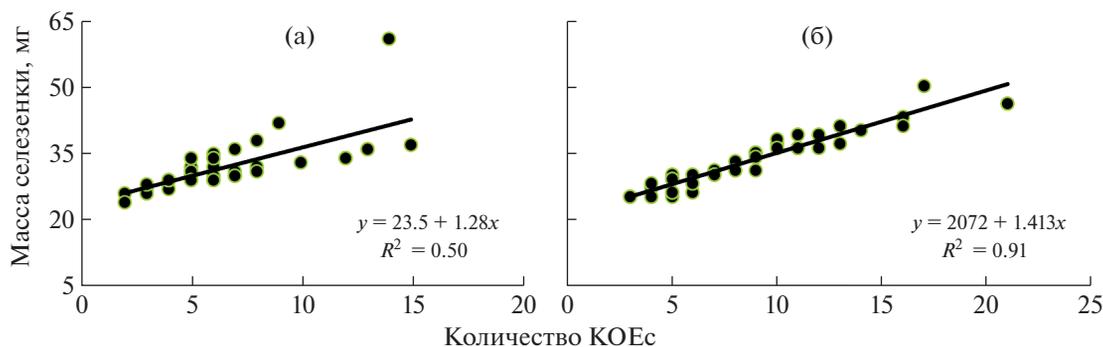


Рис. 2. Результаты регрессионного анализа связи количества КОЕс и массы селезенки у животных контрольной группы (а) и мышей, получавших Рексод® (б).

Fig. 2. Results of the regression analysis of the relationship between the number of CFUs and the mass of the spleen in the animals of the control group (a) and mice treated with Rexod® (b).

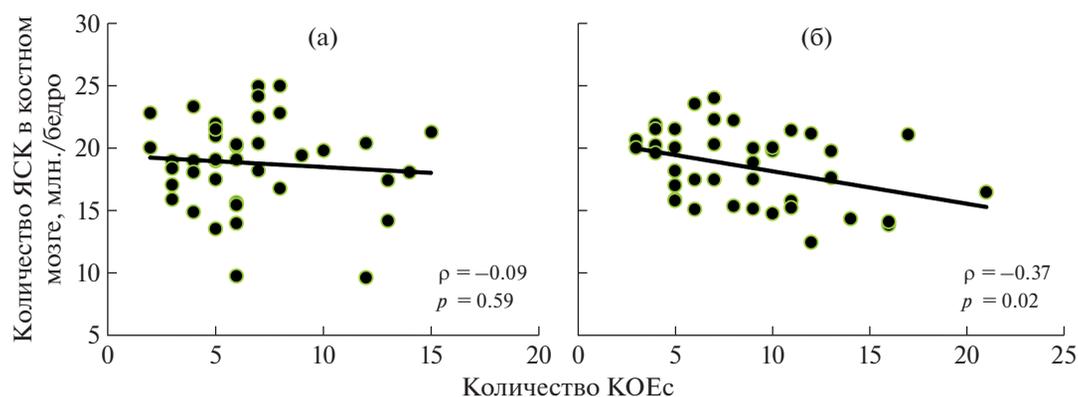


Рис. 3. Результаты корреляционного анализа связи количества КОЕс и количества ЯСК в костном мозге у животных контрольной группы (а) и мышей, получавших Рексод® (б).

Fig. 3. Results of the correlation analysis of the relationship between the number of CFUs and the number of NSCs in the bone marrow in the animals of the control group (a) and mice receiving Rexod® (b).

Важно отметить, что в сравниваемых группах не было установлено зависимости между ЯСК в костном мозге и числом лейкоцитов в периферической крови (рис. 5).

Как отмечалось выше, во второй серии экспериментов (табл. 2) было показано, что Рексод® оказывает положительное влияние на восстановление количества ЯСК в тимусе после острого облучения. Корреляционный анализ свидетельствует о принципиальном изменении зависимости числа ЯСК в тимусе от количества КОЕс у мышей, получавших препарат. Так, у мышей из группы облученного контроля была зарегистрирована статистически значимая обратная зависимость количества ЯСК в тимусе от количества КОЕс (рис. 6, а), тогда как введение препарата приводило к изменению этой зависимости с отрицательной на положительную (рис. 6, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что радиационное воздействие даже в малых дозах способно изменять содержание антиоксидантных ферментов в клетках [11]. Установлено, что редоксчувствительный NF-κB активируется малыми дозами радиации, что приводит к повышению генной экспрессии марганецзависимой СОД, ее ферментативной активности и изменению радиочувствительности клетки [12].

Ранее во многих экспериментальных и клинических исследованиях было отмечено противолучевое действие СОД при ее введении как до, так и после облучения [4, 6]. Имеются данные, что СОД-содержащие препараты способствуют уменьшению числа морфологически измененных клеток и приводят к повышению их выживаемости при γ-облучении в высоких дозах [13, 14]. Лечение препаратами СОД оказалось достаточно эффективным при лечении постлучевого фиброза [14]. Однако механизмы столь широкого биологиче-

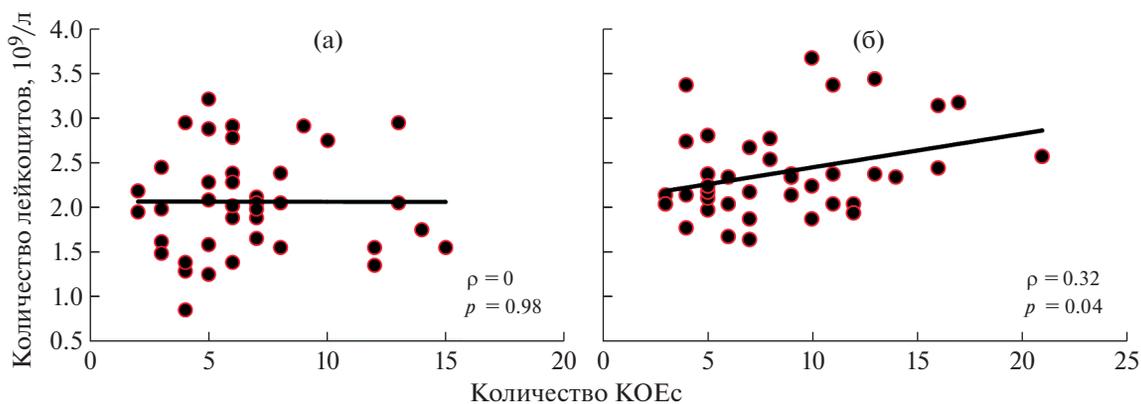


Рис. 4. Результаты корреляционного анализа связи количества КОЕс и количества лейкоцитов в периферической крови животных контрольной группы (а) и мышей, получавших Рексод® (б).

Fig. 4. Results of the correlation analysis of the relationship between the number of CFUs and the number of leukocytes in the peripheral blood of the animals of the control group (a) and mice receiving Rexod® (b).

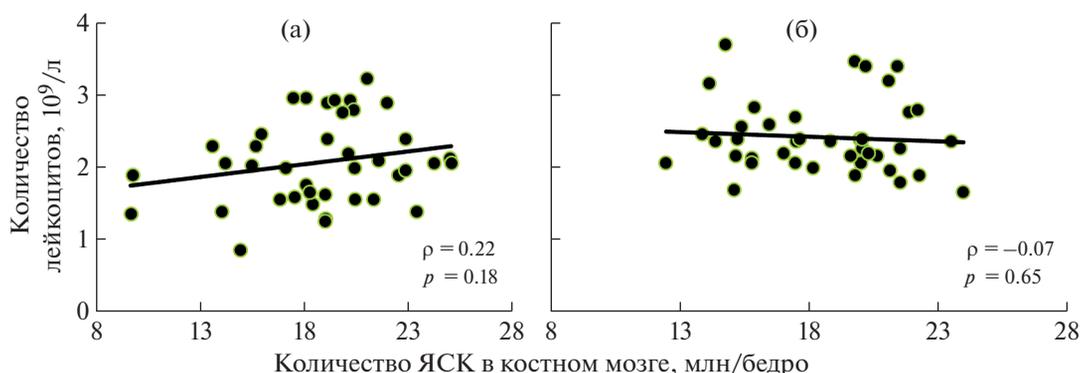


Рис. 5. Результаты корреляционного анализа связи количества ЯСК в костном мозге и количества лейкоцитов в периферической крови у животных контрольной группы (а) и мышей, получавших Рексод® (б).

Fig. 5. Results of the correlation analysis of the relationship between the number of NSC in the bone marrow and the number of leukocytes in the peripheral blood in the animals of the control group (a) and mice receiving Rexod® (b).

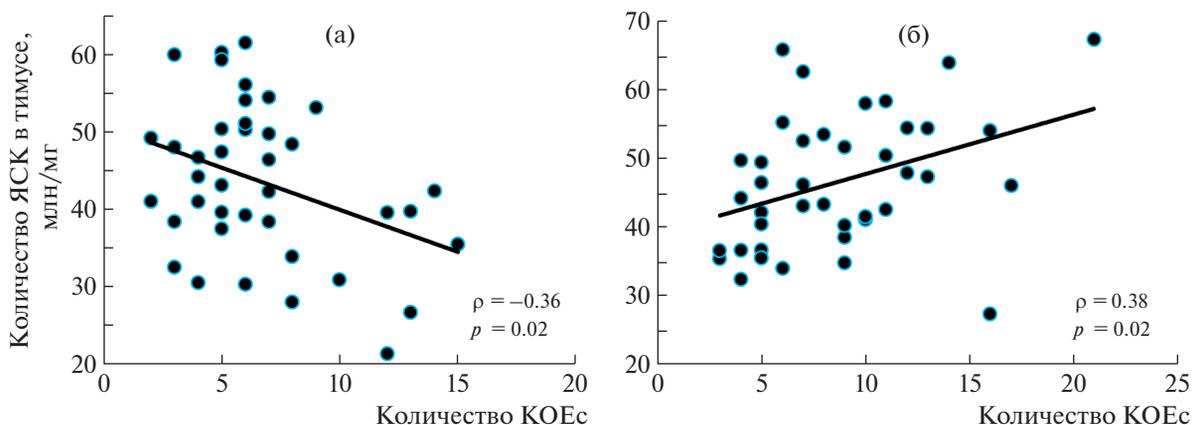


Рис. 6. Результаты корреляционного анализа связи количества КОЕс и количества ЯСК в тимусе у животных контрольной группы (а) и облученных мышей, получавших Рексод® (б).

Fig. 6. Results of the correlation analysis of the relationship between the number of CFUs and the number of NSCs in the thymus in the animals of the control group (a) and irradiated mice receiving Rexod® (b).

ского действия препаратов СОД до настоящего времени остаются неясными. Можно полагать, что эффективность СОД при ряде заболеваний различной этиологии может быть обусловлена ее действием на стволовые клетки, а универсальный механизм радиозащитного действия СОД, связанный с инактивацией активных форм кислорода и азота, обусловлен предохранением стволовых клеток различных тканей от оксидативного повреждения.

Оценка эффективности действия рекомбинантного препарата Рексод® в поддержании пула стволовых клеток после острого облучения, проведенная с использованием теста КОЕс, показала его высокую эффективность. По результатам пилотного исследования было установлено, что препарат СОД при внутривенном введении в дозе 180 мг/кг за 15 мин до острого тотального γ -облучения в дозе 4 Гр в тесте оценки КОЕс (эндоколонии) повышает выживаемость стволовых клеток у мышей инбредной линии С57В1/6. Эффект был подтвержден в двух сериях независимых экспериментов.

Анализ зависимости массы селезенки от количества КОЕс позволяет интерпретировать полученные результаты с точки зрения пролиферативной активности стволовых клеток, формирующих колонии. Поскольку коэффициент, отражающий наклон линии регрессии, характеризует среднюю массу колоний, статистически значимое увеличение этого коэффициента может свидетельствовать как о повышении пролиферативной активности стволовых клеток, так и об увеличении их выживаемости. В настоящем исследовании не было выявлено статистически значимых отличий массы одной колонии в группе облученного контроля (1.28 ± 0.21 мг) от значения показателя в группе, где облученные животные получали Рексод® (1.41 ± 0.07 мг, $p = 0.55$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что Рексод®, по-видимому, повышает только выживаемость стволовых клеток, но не влияет на их пролиферативную активность.

В настоящее время установлено, что критическими факторами выживания КСК при оксидативном стрессе являются гены *FoxO* и их транскрипционные факторы. Предполагается, что они играют важную роль в регуляции клеточного цикла, поддерживая состояние покоя КСК и сохраняя в течение длительного времени их самообновление и репопуляцию. Показано, что транскрипционный фактор *FoxO3* подавляет образование активных радикалов в КСК посредством стабилизации гена *ATM* [15].

Результаты корреляционного и регрессионного анализа позволили предположить, что у облученных животных, получавших Рексод®, преобладает кроветворение в селезенке. Предполагается

о влиянии СОД на перераспределение гемопоэза у облученных животных из преимущественно костномозгового в преимущественно селезеночный находит свое подтверждение при корреляционном анализе зависимости числа лейкоцитов в периферической крови и КОЕс. Отмеченная отрицательная корреляционная зависимость между количеством КОЕс и ЯСК в костном мозге, а также положительная связь между КОЕс и количеством лейкоцитов в периферической крови у облученных мышей, получавших Рексод®, по сравнению с отсутствием таковых у мышей из группы облученного контроля, позволяет предположить, что СОД у облученных животных приводит к перераспределению активного гемопоэза из костного мозга в селезенку.

Перераспределение активного гемопоэза из костного мозга в селезенку у облученных мышей, получавших препарат, позволяет полагать, что СОД повлиял на структуру гемопоэза. О вовлечении СОД в сигнальные пути регуляции гемопоэза свидетельствует участие внеклеточной СОД в регуляцию экспрессии гена эритропоэтина [16].

Отмеченное в исследовании противолучевое действие Рексод® на КОЕс может косвенно свидетельствовать о потенциальной эффективности препарата в отношении стволовых клеток и других органов (например, костного мозга и тимуса). Было отмечено, что на 9-е сутки после облучения препарат повышает количество ядерных клеток в тимусе, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у облученных мышей по сравнению с облученным контролем. Анализ числа эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у облученных в сублетальных дозах животных, получавших СОД, свидетельствует о достаточной активации гемопоэза в целом. Активация кроветворения, возможно, связана с повышением выживаемости стволовых клеток не только селезенки, но и костного мозга и тимуса. Ранее в модели нокаутных животных с сочетанным дефицитом генов *Fancc*-/*Sod1*-/- было показано, что СОД способна оказывать влияние на пролиферацию и выживаемость кроветворных клеток [17].

Кроме радиозащитного действия выявлено стимулирующее действие Рексод® на эритропоэз и лимфопоэз в тимусе у необлученных животных. Изменение зависимости между числом КОЕс и ЯСК тимуса с отрицательной у животных γ -контроля на положительную у облученных мышей, получавших Рексод®, позволяет предположить, что СОД оказывает влияние не только на гемопоэз, но и на иммунитет. Ранее было показано, что внеклеточная СОД-3, которая является изоформой СОД, контролирует иммунный ответ, регулируя созревание дендритных клеток, активацию и пролиферацию Т-клеток, а также дифференцировку Т-хелперов 2-го типа (Th2) и регуляторных

Th17. Предполагается, что СОД участвует в регуляции адаптивного иммунитета опосредованно через влияние на экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего пилотного исследования свидетельствуют о повышении выживаемости кроветворных стволовых клеток у мышей линии C57Bl/6 в тесте оценки КОЕс (эндоколонии) после острого тотального γ -облучения мышей в сублетальной дозе при внутрибрюшинном введении рекомбинантной СОД человека производства ГосНИИ ОЧБ ФМБА России (торговое наименование Рексод®) в дозе 180 мг/кг за 15 мин до облучения. Показано, что СОД способна регулировать иммуногемопоз. Результаты эксперимента продемонстрировали, что СОД изменяет баланс костномозгового и селезеночного кроветворения и вызывает перераспределение активного гемопоэза из костного мозга в селезенку. Выявлено стимулирующее действие Рексод® на эритропоэз и Т-лимфопоэз у необлученных животных. Вышеуказанные эффекты могут быть связаны как с СОД-индуцированным повышением выживаемости стволовых клеток костного мозга и тимуса, так и с изменением баланса активности гемопоэза в организме.

Отмеченные модифицирующие иммуногемопоз эффекты СОД требуют более детального изучения для прояснения механизмов. Полученные результаты указывают на то, что лекарственный препарат Рексод® является перспективным средством для коррекции иммуногемопоза, в том числе и после радиационного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M. et al. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. ICRP Publication 118 / Ed. C.H. Clement // Elsevier. 2012. P. 322.
2. Shirazi A., Ghobadi G., Ghazi-Khansari M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector // J. Radiat. Res. 2007. V. 48. P. 263–272.
3. Tulard A., Hoffschir F., de Boisferon F.H. et al. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity // Free Radic. Biol. Med. 2003. V. 35. P. 68–77.
4. Пушкина Т.А., Токаев Э.С., Попова Т.С., Бородин Е.Н. Супероксид-дисмутаза в составе антиоксидантной терапии: состояние вопроса и перспективы (обзор литературы) // Журн. им. Н.В. Склифосовского “Неотложная медицинская помощь”. 2016. № 4. С. 42–47. [Pushkina T.A., Tokayev E.S., Popova T.S., Borodina E.N. Superoxide dismutase as a component of antioxidant therapy: current state of the issue and prospects. A literature review // Russian Sklifosovsky Journal “Emergency Medical Care”. 2016. № 4. P. 42–47. (In Russian)]
5. Antonic V., Rabbani Z.N., Jackson I.L., Vujaskovic Z. Subcutaneous administration of bovine superoxide dismutase protects lungs from radiation induced lung injury // Free Radic. Res. 2015. V. 49. № 10. P. 1259–1268.
6. Деримедведь Л.Ю. Экспериментальное обоснование использования препаратов супероксиддисмутаза при патологических состояниях, обусловленных активацией процессов свободнорадикального окисления: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. К., 2006. [Derimedved L.Yu. Experimental justification of the use of superoxide dismutase preparations in pathological conditions caused by the activation of free radical oxidation processes: Dis. Abstr. ... Dr Med. Sci. K., 2006. (In Russian)]
7. Козлов Д.Г., Ефремов Б.Д., Ломакин И.Г. и др. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент СОД человека: Патент РФ № 2044771, сентябрь, 1995. [Kozlov D.G., Efremov B.D., Lomakin I.G. et al. *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain – producer of human SOD: RF Patent № 2044771, September, 1995. (In Russian)]
8. Коноплянников А.Г., Коноплянников М.А. Стволовые клетки и регенеративная медицина // IV Всерос. науч. шк.-конф. 24–27 октября 2011 г. М.: Изд-во МГУ, 2011. С. 47. [Konoplyannikov A.G., Konoplyannikov M.A. Stem cells and regenerative medicine // IV All-Russian Scientific School-Conference October 24–27, 2011 Moscow: Publishing House of Moscow State University, 2011. P. 47. (In Russian)]
9. Переверзев А.К. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы. Л.: Наука, 1986. 172 с. [Pereverzev A.K. Hematopoietic colony-forming cells and physical stressors. L.: Nauka, 1986. 172 p. (In Russian)]
10. Гринхальт Т. Основы доказательной медицины: Пер. с англ. И.Н. Денисова, К.И. Сайткулова. М.: Гэотар Медиа, 2008. 54 с. [Greenhalgh T. Foundations of evidence based medicine: Trans. from English I.N. Denisova, K.I. Saitkulova. M.: Geotar Media, 2008. 54 p. (In Russian)]
11. Klucinski P., Wojcik A., Grabowska-Bochenek R. et al. Erythrocyte antioxidant parameters in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation // Ann. Agric. Environ. Med. 2008. V. 15. P. 9–12.
12. Murley J.S., Nantajit D., Baker K.L. et al. Maintenance of manganese superoxide dismutase (SOD2)-mediated delayed radioprotection induced by repeated administration of the free thiol form of amifostine // Radiat. Res. 2008. V. 169. P. 495–505.
13. Prasad K.N. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation // Br. J. Radiol. 2005. V. 78. P. 485–492.
14. Campana F., Zervoudis S., Perdereau B. et al. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis // J. Cell. Molec. Med. 2004. V. 8. № 1. P. 109–116.
15. Tothova Z., Kollipara R., Huntly B.J. et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress // Cell. 2007. V. 128. P. 325–339.

16. Zelko I.N., Folz R.J. Extracellular superoxide dismutase functions as a major repressor of hypoxia-induced erythropoietin gene expression // *Endocrinol.* 2005 Jan. V. 146. № 1. P. 332–340. Epub. 2004 Sep 16. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1007>
17. Hadjur S., Ung K., Wadsworth L. et al. Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase // *Blood.* 2001. Aug. 15. V. 98. № 4. P. 1003–1011. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.1003>
18. Myung-Ja K., Yun-Jae J., Kyo-Young L., Tae-Yoon K. Superoxide dismutase 3 controls adaptive immune responses and contributes to the inhibition of ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice // *Antioxid Redox Signal.* 2012. Nov. 15. V. 17. № 10. P. 1376–1392. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4572>

The Influence of the Superoxide Dismutase Preparation “Rexod®” on Survival of CFUs in C57BL/6 Mice

A. V. Akleyev^{a,b}, I. A. Shaposhnikova^{a,#}, I. V. Churilova^c, A. N. Grebenyuk^{c,d}, and E. A. Pryakhin^a

^a *Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Chelyabinsk, Russia*

^b *Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia*

^c *State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russia*

^d *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia*

[#] *E-mail: shaposhnikova@lenta.ru*

Radioprotective efficiency of the preparation Rexod® (State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical-Biological Agency of Russia) containing recombinant human superoxide dismutase (SOD) has been investigated in terms of survival and proliferative activity of hematopoietic stem cells in male C57Bl/6 mice of SPF category following acute external γ -irradiation. The animals were subjected to acute total γ -irradiation with the γ -unit IGUR-1M (4 sources of ^{137}Cs). The dose of γ -exposure was within the range 3.0–7.5 Gy, and the absorbed dose-rate was 0.78 Gy/min. A single dose of 180 mg/kg (in 1 ml total volume) recombinant SOD was administered intraperitoneal 15 minutes prior to irradiation. Mice from the control group similarly received the same volume but of normal saline. Radioprotective properties of SOD were assessed based on the number of CFU (endotest), nucleated cells in bone marrow and thymus, erythrocytes and leukocytes in the peripheral blood, and mass of thymus and spleen. It was shown that the use of SOD makes it possible to increase the survival of CFUs after acute sublethal γ -irradiation of mice. The registered changes in the CFUs amount and in other hematological parameters testify to the fact that the administered SOD stimulates hematopoiesis in spleen. The revealed stimulatory effect of SOD on the erythropoiesis and the number of nucleated cells in thymus both in irradiated and non-irradiated animals opens up new opportunities for the use of the preparation and requires further studies of the mechanisms of the detected effects.

Key words: ionizing radiation, superoxide dismutase, hematopoietic stem cells, CFUs, survival

НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 591.18:591.147.6:599.323.4:57.084.1:537.8

ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И УРОВЕНЬ КОРТИКОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ СЕМИДНЕВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСЕКУНДНЫМ ИМПУЛЬСНЫМ МИКРОВОЛНОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

© 2021 г. А. В. Самойлова^{1,2,3,*}, М. А. Большаков^{1,3}, Л. П. Жаркова^{1,3}, А. А. Гостюхина^{1,4},
О. П. Кутенков¹, В. В. Ростов¹

¹ Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

⁴ Сибирский Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

*E-mail: kereya21@mail.ru

Поступила в редакцию 29.10.2019 г.

После доработки 15.09.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Исследовано влияние наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ, 4000 импульсов ежедневно, частоты повторения импульсов 13 и 22 Гц, пиковая плотность потока мощности (пППМ) 1500 Вт/см², несущая частота 10 ГГц) на головной мозг лабораторных мышей. Эффект воздействия оценивали по изменению поведенческих реакций мышей в “открытом поле” и уровню гормона кортикостерона в сыворотке крови животных в динамике. Установлено, что 3-, 5- и 7-дневное облучение наносекундным ИПМИ разнонаправленно влияет на поведенческие реакции мышей и содержание кортикостерона. Выявленные эффекты воздействия зависят от частоты повторения импульсов ИПМИ. Полученные результаты указывают на непосредственное влияние излучения на головной мозг – оно может стимулировать развитие разных фаз общего адаптационного синдрома (стресса) в организме после облучения наносекундным ИПМИ.

Ключевые слова: наносекундные микроволновые импульсы, облучение мозга, поведение мышей, кортикостерон

DOI: 10.31857/S0869803121020107

В настоящее время источники наносекундных микроволновых импульсов малой длительности (единицы-десятки наносекунд) с высокой пиковой плотностью потока мощности (пППМ) (единицы-десятки кВт/см²) используются в научно-исследовательской деятельности при тестировании радиоэлектронной аппаратуры на электромагнитную устойчивость, в дефектоскопии материалов и конструкций [1]. Предполагается, что наносекундные ИПМИ в дальнейшем будут использоваться в медицине, ветеринарии и биотехнологии. При этом возникает вопрос относительно безопасности воздействия данных излучений на человека, прежде всего, на обслуживающий персонал. Все вышеперечисленное определяет актуальность исследования на лабораторных животных физиологических эффектов и закономерностей действия наносекундных микроволновых излучений.

Ранее выполненными экспериментами показано, что наносекундные импульсные микроволны влияют на развитие дрозофилы, синтез нуклеиновых кислот и пролиферацию опухолевых клеток, изменяют показатели периферической крови, структуру и функцию печени крыс, влияют на регенерацию кожных ран и изъязвлений слизистой желудка, изменяют уровень АФК в митохондриях гепатоцитов и активность ферментов антиоксидантной защиты митохондрий [2–4]. Все выявленные эффекты зависят от интенсивности воздействия и частоты повторения импульсов. Относительно недавно было показано: наносекундное ИПМИ влияет на головной мозг мышей, что проявляется изменением активности нейтронов гипоталамуса и ретикулярной формации [5]. Как известно, в регуляции всех физиологических функций организма важнейшую роль играет головной мозг. Поэтому нейрофизиологические эффекты низкоинтенсивного микровол-

нового излучения активно изучались и продолжают изучаться. В частности, в одном из недавних исследований было показано, что повторяющиеся в течение 15 дней воздействия немодулированным ЭМИ (10 ГГц, по 2 ч ежедневно) изменяют поведение мышей и способствуют формированию окислительного стресса в тканях мозга [6]. В этом плане пока неясно, как будет реагировать организм на облучение мозга наносекундными микроволновыми импульсами, будет ли эффект зависеть от частоты повторения, как это наблюдалось ранее в экспериментах с воздействием модулированных ЭМИ на ЦНС [6, 7]. В частности, было показано, что воздействие на целостный организм мышей сопровождается рядом физиологических реакций, которые трактуются авторами как развитие стресса [8].

Исходя из изложенного, целью настоящего исследования было изучить реагирование организма лабораторных мышей в динамике после локального воздействия на головной мозг наносекундного ИПМИ с оценкой эффекта изменения поведенческой активности и уровня кортикостерона в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперименты выполнены на 84 половозрелых белых мышах самцах массой 25–30 г. Животных содержали при комнатной температуре и постоянной влажности, в клетках при световом режиме освещения 12:12, на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Исследование проводили в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными и санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник [9]. Мыши были разделены на группы облученных и ложнооблученных (ЛО, контроль), по шесть животных для каждого из использованных режимов воздействия. В ходе исследования контрольных мышей подвергали всем аналогичным манипуляциям, что и облученных, но без включения микроволнового генератора. Процедуры облучения проводили в одно и то же время суток (с 9.00 до 11.00 час.). Для обеспечения локального воздействия на головной мозг и устранения возможности облучения всего организма тело животных (кроме головы) на время облучения покрывали радиопоглощающим материалом. Голова животного в течение 3, 5, 7 дней в соответствующих группах мышей подвергалась ежедневному однократному воздействию ИПМИ (4000 импульсов за сеанс) с частотой повторения 13 и 22 Гц. Эти частоты по результатам ранее проведенных исследований показали наибольшую биологическую эффективность. Кроме того, они соответствуют основным частотам спектра электроэнцефалограмм мозга,

и, как полагают некоторые авторы [7], воздействие с такими частотами может наиболее эффективно влиять на деятельность мозга. Продолжительность облучения варьировала от 5 до 10 мин в зависимости от частоты повторения импульсов. В качестве источника ИПМИ использовали лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО “Тантал”, Россия). Несущая частота генератора составляла 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс. Пиковая интенсивность, составившая во всех экспериментах 1500 Вт/см², оценивалась с помощью стандартных методик на основе антенных измерений и калориметрических калибровок [10]. Во время воздействий животных в пластиковых контейнерах диаметром 3 см помещали в дальней зоне рупора антенны на расстоянии 20 см. Это обеспечивало воздействие на область головы мышей при средних значениях интенсивности от 0.6 до 2.4 мВт/см². Мышей подвергали облучению с удельной поглощенной мощностью (УПМ) 7.8 и 9.6 мВт/г при частотах повторения 13 и 22 Гц соответственно. УПМ оценивали в соответствии с общепринятой методикой по скорости нагрева тканей головного мозга [11]. Определение скорости нагрева, а также контроль температуры тканей во время экспериментов осуществляли с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия). Реакции на воздействие ИПМИ оценивали по поведению мышей в “открытом поле” и уровню гормона кортикостерона в сыворотке крови животных. Эффект воздействия ИПМИ оценивали по изменению показателей облученных животных относительно ложнооблученных (ЛО). В качестве индикаторных показателей в “открытом поле” были исследованы общая двигательная и вертикальная активности, норковых рефлекс, количество дефекаций и уринаций, груминг, реакции замирания. Тестирование в круглой арене “открытого поля” при уровне освещенности 180 лк, что оценивалось с помощью измерителя потока света (Pocket light meter 8581, Тайвань), проводили в течение 5 мин у экспериментальных и ложнооблученных (контрольных) животных дважды — за день до начала облучения и на следующий день после окончания воздействий (на 4-й, 6-й и 8-й дни после 3-, 5- и 7-дневного облучения соответственно). Через сутки после тестирования в открытом поле животных всех групп выводили из эксперимента одномоментным декапитированием под СО₂ наркозом. У декапитированных животных для получения сыворотки кровь собирали в чистую сухую пробирку. Затем кровь центрифугировали без охлаждения 2000 об/мин в течение 15 мин, полученную сыворотку собирали в пробирку Eppendorf. Для проведения иммуноферментного анализа образцы сыворотки центрифуги-

Таблица 1. Поведение мышей в “открытом поле” после облучения головного мозга наносекундными импульсными микроволнами с пППМ 1500 Вт/см²
Table 1. The behavior of mice in the “open field” after irradiation of the brain with nanosecond pulsed microwaves with a RPM of 1500 W/cm²

Показатель поведенческой активности в “открытом поле”	Экспериментальные группы (n = 6)								
	контроль			13 Гц			22 Гц		
	Дни облучения								
	3	5	7	3	5	7	3	5	7
ОДА	166.5 ± 20.4	145.2 ± 25.3	123.8 ± 15.2	124.2 ± 16.4*	128.8 ± 20.9	179.0 ± 20.5**	148.3 ± 16.0	98.5 ± 21.3*	131.2 ± 28.6
ВА	33.7 ± 6.6	28.0 ± 6.6	19.2 ± 5.6	27.0 ± 5.4	28.3 ± 6.1	35.7 ± 4.8	26.0 ± 5.6	22.0 ± 5.8	24.3 ± 7.0
НР	40.2 ± 6.1	33.5 ± 5.6	28.3 ± 4.9	21.8 ± 3.3*	19.0 ± 3.3*	19.2 ± 1.7*	35.2 ± 3.3	14.0 ± 4.8*	15.5 ± 3.7*
Гр	1.2 ± 0.7	0.5 ± 0.2	1.5 ± 0.7	1.8 ± 0.6	2.8 ± 1.1	0.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3	4.7 ± 2.1**	2.3 ± 0.5
Дф	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.8	2.8 ± 0.7	1.7 ± 0.4	2.5 ± 0.8	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	2.5 ± 0.7

Примечание. n – число мышей в группе; ОДА – общая двигательная активность, ВА – вертикальная активность, НР – норковый рефлекс, Гр – груминг, Дф – дефекации.

* Снижение показателя относительно контрольной группы, ** – увеличение показателя относительно контрольной группы; *, ** различия статистически значимы (p ≤ 0.05).

гировали 1000 об/мин в течение 2 мин. В сыворотке крови облученных и ложнооблученных мышей с помощью твердофазного иммуноферментного “сэндвич” метода (ELISA) определяли содержание гормона кортикостерона. Процедура выполнения иммуноферментного анализа проводилась по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (“DRG”, Германия). Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statsoft STATISTICA for Windows 8.0, при которой рассчитывались средняя арифметическая величина показателя и ошибка средней. Значимость различий между показателями облученных и ложно облученных животных определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Корреляционную зависимость между показателями поведенческих реакций и уровнем кортикостерона, а также зависимость от частоты повторения импульсов определяли с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное исследование и анализ полученных результатов позволили установить, что воздействие наносекундным ИПМИ на головной мозг лабораторных мышей влияет на него и изменяет функциональное состояние организма. Зарегистрированные эффекты проявляются в разнонаправленном изменении поведенческих реакций в “открытом поле”, а также в изменении содержания кортикостерона в сыворотке крови.

Поведенческие реакции мышей в “открытом поле” после воздействия на головной мозг наносекундным ИПМИ. После облучения в течение 3 дней го-

ловного мозга мышей ИПМИ с частотой повторения 13 Гц происходило статистически значимое снижение общей двигательной и норковой активностей по сравнению с контрольной группой (табл. 1). В дальнейшем, с 5-го по 7-й дни воздействий, норковая активность продолжала снижаться, а общая двигательная активность, напротив, возрастала. Можно предположить, что у животных наблюдался период адаптации к воздействующим факторам, характеризующийся развитием стадии резистентности.

После воздействия ИПМИ с частотой повторения 22 Гц с 3-го по 7-й день облучения общая двигательная активность изменялась волнообразно. На 3-е сутки отмечалось ее увеличение, на 5-е сутки происходило снижение, а на 7-й день – вновь увеличение показателя до аналогичного уровня в контрольной группе. При этом с 5-х по 7-е сутки облучения регистрировалось снижение норковой активности. Параллельно с этим на 5-й день отмечалось повышение груминга, который к 7-м суткам снижался до уровня у ложнооблученных мышей (табл. 1).

Полученные результаты определенно указывают, что после воздействия на головной мозг мышей наносекундным ИПМИ через 3 дня у животных формируются тревожность и подавленное состояние. Тем не менее с 5-го по 7-й дни облучения мышей с частотой 22 Гц поведенческие показатели достигают уровней ложнооблученной группы, что, по-видимому, характеризует фазовый переход общего адаптационного синдрома от тревоги к истощению у мышей [12].

Анализ контрольной (ложнооблученной) группы выявил тенденцию к снижению общей двигательной активности в “открытом поле” от

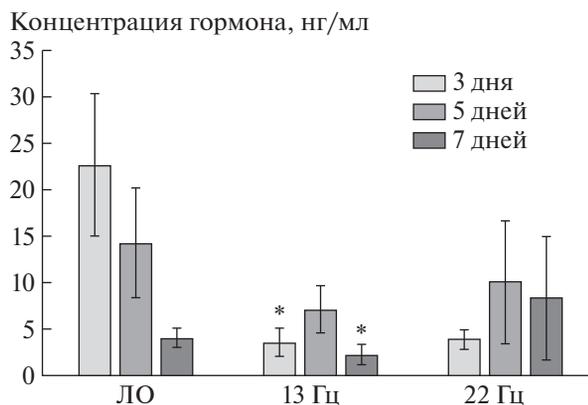


Рис. 1. Динамика содержания кортикостерона в сыворотке крови мышей после воздействия наносекундным ИПМИ (пППМ 1500 Вт/см²) на головной мозг в течение 3, 5 и 7 дней облучения.

Примечание. Представлены среднеарифметические значения показателя \pm ошибки среднего.

* Различия статистически значимы по отношению к показателям ЛО животных ($p \leq 0.05$).

Fig. 1. Dynamics of corticosterone level in the mice blood serum after brain exposure to nanosecond RPM (peak power density of 1500 W/cm²) at 3, 5 and 7 days.

Note. The arithmetic mean values of the indicator are presented \pm error of the mean.

* Differences are statistically significant in relation to the Sham indicators of animals ($p \leq 0.05$).

3-го к 7-му дню эксперимента. По-видимому, нахождение мышей в условиях ограничения движений, аналогичных условиям облучения, но без включения источника ИПМИ, приводило к фазовому развитию стадии тревоги. Снижение двигательной активности к 7-му дню эксперимента может свидетельствовать о развитии стадии истощения, что подтверждается увеличением количества актов дефекаций (табл. 1).

Динамика содержания кортикостерона в сыворотке крови после воздействия наносекундным ИПМИ на головной мозг. Изменение двигательной активности, указывающее на возможность развития стресса в организме, предполагает дополнительную проверку с измерением уровня общепринятого индикатора у грызунов — гормона кортикостерона. Известно, что стрессорные нагрузки разного характера вызывают достоверное увеличение уровня кортикостерона в плазме крови у крыс [13, 14].

В настоящем исследовании выяснилось, что уровень кортикостерона в ложнооблученной группе мышей после 3 и 5 дней эксперимента был выше по сравнению с облученными группами (рис. 1).

Поскольку ложнооблученные животные на протяжении 3 и 5 дней ежедневно в течение 3–5 мин подвергались размещению в специальных камерах, предназначенных для облучения опытных групп, вероятной причиной такого повышения

могло быть развитие стресса в связи с нахождением мышей в узких пеналах. Однако при ежедневном ограничении подвижности в течение 7 дней уровень гормона достоверно снижался. Известно, что 3-часовая иммобилизация в тесных пеналах неодинаково влияет на индивидуальные значения уровня кортикостерона в плазме крови у лабораторных крыс [14]. В этом исследовании было показано, что средняя концентрация кортикостерона у крыс, подвергшихся иммобилизации, достоверно повышалась, однако у 30% особей после пребывания в таких условиях уровень этого гормона, наоборот, снижался [14]. Можно предположить, что в нашем эксперименте у мышей с 3-го по 7-й день ограничения движений в узких пеналах с продолжительностью от 3 до 5 мин последовательно формируются стадии общего адаптационного синдрома — от тревоги до истощения [15].

У облученных ИПМИ мышей с частотой повторения импульсов 13 Гц отмечалось значительное снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови через 3 и 7 дней после облучения (рис. 1). При этом не обнаружилось статистически значимых различий между группами, облученными с обеими частотами повторения импульсов. Согласно литературным данным, снижение концентрации кортикостерона в кровотоке может свидетельствовать о развитии заключительной фазы стресса — истощении [15]. Однако обнаруженная высокая положительная корреляционная связь ($r = 0.88$) между уровнем кортикостерона и количеством актов груминга у мышей, облученных в течение 5 дней с частотой 22 Гц, может означать, что в этот период сочетание двух стрессорных нагрузок в виде ограничения двигательной активности животных и облучения сформировало у мышей стадию тревоги. Следует отметить, что уровень кортикостерона на 5-е сутки облучения в обеих опытных группах не отличается от такового в ложнооблученной группе. Не исключено, что данный эффект воздействия двух стрессорных факторов (ограничения движений и облучения) свидетельствует о развитии перекрестной адаптации [15, 16]. По-видимому, организм мышей, адаптированный к действию одного из факторов, становится в результате этого более устойчивым к действию другого.

В совокупности полученные результаты выявили сложный характер влияния ИПМИ на мозг животных и, соответственно, на контролируемые им метаболические и физиологические процессы, что нашло отображение в изменении поведенческих реакций мышей и уровня кортикостерона в сыворотке крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с принципом Гроттгуса, биологический эффект воздействия формируется частью электромагнитной энергии, поглощенной объектом [17]. Расчеты распределения поля внутри объекта, выполненные применительно к использованному в работе наносекундному ИПМИ с пиковой плотностью потока мощности 1500 Вт/см^2 (среднее значение ППМ 1.2 мВт/см^2), показали, что при частотах повторения 13 и 22 Гц удельная поглощаемая мощность (УПМ) для мозга мышей составляет 7.8 и 9.6 мВт/г соответственно. При этом в зависимости от частоты повторения импульсов нагрев ткани головного мозга не превышает $0.4\text{--}0.7^\circ\text{C}$. Результаты этих расчетов указывают на реальную способность поля проникать в ткани и, соответственно, влиять непосредственно на головной мозг. Воздействие ИПМИ на указанные структуры способствует формированию физиологических эффектов нетепловой природы, которые выявлены в настоящей работе.

Из работ Б.И. Давыдова и соавт. следует, что стресс, индуцированный у животных микроволновым излучением, имеет характер теплового стресса, т.е. полностью определяется существенным повышением температуры на $2\text{--}5^\circ\text{C}$ в облучаемом организме, что обеспечивается воздействием со средним потоком мощности не менее 80 мВт/см^2 [17]. Поскольку использованное в настоящей работе ИПМИ по своей средней интенсивности 1.2 мВт/см^2 не обеспечивало такого нагрева, это дает основание предполагать, что стресс, обусловленный облучением ИПМИ, имеет нетепловую природу и запускается каким-то иным способом. Возможно, что на этапе первичного взаимодействия излучения с объектом влияние реализуется либо за счет модификации клеточных мембран, либо за счет прямого действия электрического поля ИПМИ на внутриклеточные заряженные комплексы (элементы нейрона, дыхательную цепь митохондрий) [18] с последующим формированием реакций облучаемого мозга.

Наиболее характерным физиологическим эффектом, наблюдавшимся после воздействия ИПМИ на головной мозг, было изменение общей двигательной и норковой активностей, а также интенсивности груминга, причем в большинстве случаев у облученных животных регистрировалось снижение этих показателей. Известно, что стресс по своей природе является защитной биологической реакцией и развивается в ответ на действие широкого спектра агрессивных факторов внешней среды, в том числе электромагнитных излучений [19]. При всех этих воздействиях активируется гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система. Центральным звеном этой системы являются нейроэндокринные нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса, синтезирую-

щие кортикотропин-рилизинг гормон, который опосредует синтез и выделение глюкокортикоидов. В условиях воздействия стрессорных факторов кортикостерон у лабораторных животных, по-видимому, является активатором или ингибитором поведенческой стратегии. Считается, что гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система активирует увеличение синтеза стресс-гормонов, требующееся для любой интенсивной работы организма [20, 21]. Однако возможно, что для повышенной устойчивости организма к неблагоприятным факторам среды при их продолжительном или повторном действии происходит не увеличение выработки этих гормонов, а наоборот, — поддерживается обычный или пониженный уровень [22].

В настоящем исследовании при определении уровня кортикостерона в сыворотке крови мышцей было установлено, что его содержание у ложнооблученных животных последовательно снижается от 3-го к 7-му дню эксперимента. Мыши этой группы оказывались в обстановке “новизны”, поскольку подвергались только кратковременному ограничению движений в связи с размещением в специальные контейнеры на несколько минут. По-видимому, в этой группе наблюдалась смена стадий общего адаптационного синдрома — от тревоги к истощению. У животных, облученных наносекундным ИПМИ, на фоне ограничения подвижности наблюдалась иная картина. Воздействие двух стрессорных факторов к 7-му дню облучения с частотой 22 Гц приводило к нормализации содержания кортикостерона в сыворотке крови и отсутствию различий между показателями поведенческой активности у опытной и контрольной групп. По-видимому, сочетанное влияние кратковременной иммобилизации и облучения ИПМИ формировало у животных перекрестную адаптацию, хотя такое объяснение требует от дальнейшего специального исследования.

Таким образом, воздействие на головной мозг мышцей наносекундным ИПМИ может быть причиной развития стресса, которое ранее наблюдалось в экспериментах с воздействием на целый организм. Не исключено, что при облучении всего организма и локальном облучении мозга срабатывают одни и те же стресс-активирующие системы, в частности, гипоталамус, что может быть подтверждено имеющимися к настоящему времени данными о поведенческих и метаболических реакциях мышцей при воздействии наносекундного ИПМИ на головной мозг [8]. Возможность подобного потенциально неблагоприятного влияния наносекундного электромагнитного фактора в плане понимания физиологических механизмов влияния требует пристального внимания и более углубленного исследования. Это актуально как в теоретическом плане, так и с практической точки зрения для определения корректных гигиенических нормативов безопасного действия. По-

лученные результаты указывают на необходимость учета потенциальной опасности облучения обслуживающего персонала при эксплуатации источников наносекундных импульсно-периодических микроволновых излучений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана программой Президиума РАН № 10 “Мощные ультракороткие электромагнитные импульсы, а также их взаимодействие с объектами и средами”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Месяц Г.А.* Импульсная энергетика и электроника. М.: Наука, 2004. 704 с. [*Mesyats G.A.* Impul'snaya energetika i elektronika. M.: Nauka, 1993. 704 s. (In Russian)]
2. *Литвяков Н.В., Булдаков М.А., Чердынцева Н.В. и др.* Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45. № 4. С. 460–463. [*Litvyakov N.V., Buldakov M.A., Cherdyntseva N.V. et al.* The repetitive high power microwave effects on synthesis of nucleic acids in tumor cells // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 2005. V. 45. № 4. P. 460–463. (In Russian)]
3. *Большаков М.А., Жаркова Л.П., Иванов В.В., и др.* Оценка активности ферментов антиоксидантной защиты митохондрий печени мышей после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2012. № 3 (19). С. 122–136. [*Bolshakov M.A., Zharkova L.P., Ivanov V.V. et al.* The activity of antioxidant enzymes of liver mitochondria of mice after exposure to nanosecond repetitive pulsed microwave // Tomsk State University Journal of Biology. 2012. V. 3. № 19. P. 122–136 (In Russian)]
4. *Жаркова Л.П., Мамонова Н.В., Князева И.Р. и др.* Регенерация нейрогенных язв слизистой желудка после облучения импульсно-периодическим микроволновым излучением // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2010. № 2 (10). С. 112–122. [*Zharkova L.P., Mamonova N.V., Knyazeva I.R. et al.* Regeneration of neurogenous mucosal ulceration after repetitive pulsed microwaves exposure // Tomsk State University Journal of Biology. 2010. V. 2. № 10. P. 112–122 (In Russian)]
5. *Кереев А.В., Большаков М.А., Ходанович М.Ю. и др.* Оценка реакции мозга мышей на воздействие наносекундных микроволновых импульсов по экспрессии белка c-fos // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 2. С. 179–184. [*Kereya A.V., Bolshakov M.A., Khodanovich M.Yu. et al.* Evaluation of mice brain reactions after nanosecond microwave pulses using c-fos expression // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 2017. V. 57. № 2. P. 179–184. (In Russian)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803117020072>
6. *Sharma A., Kesari K.K., Saxena V.K. et al.* Ten gigahertz microwave radiation impairs spatial memory, enzymes activity, and histopathology of developing mice brain // Molec. Cell. Biochem. 2017. Nov. V. 435. № 1–2. P. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3051-8>
7. *Chizhenkova R.A.* Impulse fluxes of neuronal populations of the cerebral hemispheres on exposure to weak ultrahigh frequency electromagnetic radiation // Biophysics. 2003. V. 48. № 3. P. 509–515.
8. *Knyazeva I.R., Medvedev M.A., Vasilev A.V. et al.* The features of the stress-reaction to repetitive nanosecond microwave pulses // Proceedings – 2018 20th Int. symp. on high-current electronics, ISHCE. 2018. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2018.
9. Euro guide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. London, UK: FELASA, 2007. www.felasa.eu.
10. *Klimov A.I., Eltchaninov A.A., Konobeeva E.Yu.* Measurements of Parameters of X-Band High-Power Microwave Pulses // Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Fizika. (Russian Physics Journal). 2006. V. 49. № 11. P. 431–434.
11. *Pakhomov A.G., Prol H.K., Mathur S.P. et al.* Role of Field Intensity in The Biological Effectiveness of Millimeter Waves At A Resonance Frequency // Bioelectrochem. Bioenerg. 1997. V. 43. № 1. P. 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(97\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(97)00022-6)
12. *Кириллов О.И.* Стрессовая гипертрофия надпочечников: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 1996. 43 с. [*Kirillov O.I.* Stressovaya gipertrofiya nadpochechnikov: [dissertation]. Vladivostok, 1996. 43 p. (In Russian)]
13. *Mora F., Segovia G., Del Arco A. et al.* Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration // Brain Res. 2012, Oct 2. V. 1476. P. 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.049>
14. *Умрюхин П.Е., Григорчук О.С.* Уровень кортикостерона крови и динамика кровяного давления у крыс при стрессорной нагрузке // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исследований. 2015. № 12-4. С. 668–671. [*Umriukhin P.E., Grigorchuk O.S.* Blood corticosterone concentration and dynamic of the blood pressure during stress in rats // International journal of applied and fundamental research. 2015. № 12-4. P. 668–671 (In Russian)]
15. *Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254 с. [*Sel'e G.* Essays on the Adaptation Syndrome. M.: Medgiz, 1960. 254 p. (in Russian)]
16. *Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г.* Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М.: Медицина, 1988. 253 с. [*Meerson F.Z., Pshennikova M.G.* Adaptation to the stress situations and physical activity. M.: Meditsina Publ., 1988. 253 p. (in Russian)]
17. *Давыдов Б.И., Тихончук В.С., Антипов В.В.* Биологическое действие, нормирование и защита от ЭМИ. М.: Энергоатомиздат, 1984. 177 с. [*Davydov B.I., Tikhonchuk V.S., Antipov V.V.* Biologicheskoe deistvie, normirovanie i zashchita ot EMI. M.: Energoatomizdat, 1984. 177 s. (In Russian)]
18. *Bolshakov M.A., Knyazeva I.R., Rostov V.V. et al.* Initiation of free-radical oxidation in albino mice by exposure to pulse periodic microwaves and X-rays // Biophysics. 2005. V. 50. № 1. P. 104–109.

19. Мулик А.Б. Уровень общей неспецифической реактивности организма человека: Монография / Ред. А.Б. Мулик, М.В. Постнова, Ю.А. Мулик. Волгоград: Волгоградское науч. Изд-во, 2009. 224 с. [Mulik A.B. Uroven' obshchei nespetsificheskoi reaktivnosti organizma cheloveka: monografiya / Eds A.B. Mulik, M.V. Postnova, Yu.A. Mulik. Volgograd: Volgogradskoe nauchnoe izdatel'stvo, 2009. 224 s. (In Russian)]
20. Schommer N.C., Hellhammer D.H., Kirchbaum C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress // Psychosomatic Med. 2003. V. 65. № 3. P. 450–460. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000035721.12441.17>
21. Boldyreff B., Wehling M. Aldosteron: refreshing a slow hormone by swift action // News Physiol. Sci. 2004. V. 19. P. 97.
22. Казин Э.М., Свиридова И.А., Березина М.Г. и др. Влияние социально-биологических факторов на особенности формирования приспособительных реакций учащихся в пубертатном периоде онтогенеза // Физиол. человека. 2008. Т. 34. № 4. С. 431–439. [Kazin E.M., Sviridova I.A., Berezina M.G. et al. Effect of sociobiological factors on the formation of adaptive responses in school students during puberty // Human Physiology. 2008. V. 34. № 4. P. 431–439 (In Russian)]

Behavioral Activity and Cortycosterone Level in the Mice Blood Serum During the 7-day Exposure to Nanosecond Microwave Pulses

A. V. Samoylova^{a,b,c,#}, M. A. Bolshakov^{a,c}, L. P. Zharkova^{a,c}, A. A. Gostyuhina^{a,d},
O. P. Kutenkov^a, and V. V. Rostov^a

^a Institute of High Current Electronics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

^c National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

^d Siberian Federal Scientific Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency (FMBA), Tomsk, Russia

[#]E-mail: kereya21@mail.ru

The effect of nanosecond repetitive pulsed microwave radiation (RPM, 10 GHz, 4000 pulses per day, pulse repetition frequencies of 13 and 22 Hz, peak power flux density of 1500 W/cm² and a carrier frequency of) on the brain of laboratory mice was studied. The effect was assessed in dynamics by the change in mice behavioral reactions by open field method and by the level of corticosterone in the blood serum of animals. It was found that after 3, 5 and 7 day of RPM irradiation the behavioral reactions of mice and the corticosterone level were changed in different directions. The effect depended on the pulse repetition rate of the RPMs. The data obtained indicate the development of different phases of the general adaptation syndrome (stress) in the mice organism after nanosecond RPM irradiation.

Keywords: nanosecond microwave pulses, brain irradiation, mouse behavior, corticosterone

УДК 591.18:591.51:57.084.1:599.323.4:537.8

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭМИ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

© 2021 г. В. В. Панфилова^{1,*}, О. И. Колганова¹, О. Ф. Чибисова¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск, Россия

*E-mail: whiskas04@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.06.2020 г.

После доработки 17.09.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

Представлены результаты экспериментальной работы по оценке психофизиологического статуса потомства первого поколения крыс Вистар, которые были подвергнуты длительному электромагнитному излучению диапазона мобильной связи. Условия облучения: несущая частота 1800 МГц, зона сформированной волны, ППЭ 85 мкВт/см², расстояние от источника излучения 1.3 м, 1 ч в день. Самцов и самок облучали 18 дней до спаривания, затем самок облучали с 5-го по 17-й дни беременности. Когнитивные (памятные) функции мозга потомства оценивали по способности к выработке и воспроизведению условного рефлекса активного избегания (УРАИ). У самцов первого поколения отклонений в условно-рефлекторной деятельности не выявлено. У самок первого поколения обнаружены снижение скорости обучения и нарушение долговременной памяти.

Ключевые слова: крысы Вистар, потомство, условно-рефлекторная деятельность, электромагнитное излучение, мобильная связь, безэховая камера

DOI: 10.31857/S0869803121010094

В наше время человека окружают различные изобретения, без которых нам трудно представить свою повседневную жизнь. Например, мобильный телефон. Уже сейчас в мире беспроводной связью пользуется большая часть населения, она стала неотъемлемой частью жизни многих людей [1]. В настоящее время появилось большое количество публикаций на тему воздействия электромагнитного излучения (ЭМИ) от мобильных телефонов на здоровье людей, что позволяет нам говорить о безусловной актуальности и важности этой проблемы и необходимости ее обсуждения [2–9].

Все чаще встречаются работы в отечественной и зарубежной литературе об отклонениях со стороны центральной нервной системы (ЦНС) при использовании мобильных телефонов [10–12]. Это обусловлено тем, что ЦНС оказывается наиболее чувствительной к действию ЭМИ [12]. Было показано некоторое снижение показателей работоспособности, внимания и памяти у детей – пользователей мобильных телефонов, хотя показатели снижались лишь до нижних границ возрастной нормы [13]. Достаточно интересны исследования о влиянии ЭМИ на формирование памяти на модели импринтинга (запечатления) у цыплят. Результаты, полученные в ходе данной

работы, показали, что кратковременное воздействие ЭМИ, начиная с плотности потока энергии (ППЭ) 0.4 мВт/см², на эмбрионы цыплят в разные сроки развития вызывало потерю способности к запечатлению [14]. В экспериментальной работе, посвященной воздействию циклического облучения на животных, были получены данные о том, что хроническое облучение (4 мес., 2 ч в день, ср. ППЭ 500 мкВт/см²) приводило к нарушению памяти у крыс по тестам открытого поля и поведения в лабиринте [15]. Нами ранее были показаны снижение общей возбудимости и угнетение когнитивных функций у крыс Вистар после однократного (30 мин) воздействия низкоинтенсивным широкополосным импульсно-модулированным ЭМП [16], захватывающим диапазон частот мобильной связи.

Этим обусловлена актуальность продолжения экспериментального изучения влияния ЭМИ на психофизиологический статус потомства облученных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В исследовании использовали 15 самцов крыс Вистар, 30 самок крыс Вистар и 107 особей первого поколения.

В ходе эксперимента неполовозрелых самцов и самок крыс Вистар (возраст 40–43 дня) подвергали хроническому воздействию ЭМИ, частота 1800 МГц, ППЭ 85 мкВт/см², 1 ч в день, 18 дней в безэховой камере. Источник ЭМИ – генератор сигналов E82257D (США). Измерение ППЭ проводили измерителем уровня электромагнитных излучений ПЗ-31 (Россия). Животных из контрольной группы подвергали ложному облучению в безэховой камере по 1 ч в день в течение 18 дней. После этого облученных самок подсаживали к облученным самцам из расчета 2:1. Аналогичные действия производили и с контрольными животными. Начало беременности, ее первый день, определяли по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках. Беременные самки были разделены на опытную и контрольную группы. Беременные самки из опытной группы подвергались хроническому ЭМИ в безэховой камере 1 ч в день, с 5-го по 17-й день беременности. Условия облучения: несущая частота 1800 МГц, зона сформированной волны, ППЭ 85 мкВт/см², расстояние от источника излучения 1.3 м. Самок из контрольной группы подвергали ложному облучению в безэховой камере. Самки опытной и контрольной группы принесли помет. В группы для дальнейшего тестирования условно-рефлекторной деятельности в возрасте 1 мес. отбирали внешне здоровых детенышей от каждой самки-матери и дорастивали их до 3-месячного возраста. Животных содержали в стандартных условиях вивария МРНЦ им. А.Ф. Цыба: по шесть животных в полипропиленовых клетках, с соблюдением санитарных правил содержания животных, на рационе, состоящем преимущественно из брикетированного корма, согласно нормативам лабораторного животноводства.

Когнитивные (памятные) функции мозга оценивали по способности к выработке и воспроизведению условного рефлекса активного избегания (УРАИ). Более подробно данная методика описана в работе [17]. В экспериментах использовали стандартную методику обучения крыс в челночной камере Шаттл-бокс. Выработка и закрепление рефлекса активного избегания наказания путем перебежки в другой отсек челночной камеры оценивались по комплексу показателей, адекватно отражающих конечную результативность и динамику нарастания обученности.

Фиксировали следующие количественные показатели: 1) число нанесенных током ударов до регистрации первой реакции избегания (РИ) – лаг-фаза обучения; 2) общее число РИ за сессию; 3) количество перебежек в другой отсек после удара током; 4) число отказов (отсутствии перебежек даже на электрокожное подкрепление); 5) наличие крыс, имеющих серии из пяти и более РИ подряд (критерий оценки состояния консо-

лидации памятного следа) и количество попыток до появления первой серии; 6) среднее по группе значение латентного периода РИ либо перебежки.

При анализе динамики обучения использовали расчет кривых линейной регрессии, при этом получали соответствующие уравнения с коэффициентами, отражающими наклон кривой, т.е. скорость обучения (коэффициент В), а также расчетные начальные параметры, характеризующие различия в сохранности выработанного навыка при повторных тестированиях (коэффициент А). Уравнение содержало стандартные ошибки коэффициентов, что давало возможность оценить статистически различия между кривыми. С помощью уравнений линейной регрессии оценивали: 1) динамику количества РИ в процентах к максимально возможному за интервал в десять попыток с шагом в две попытки индивидуально у каждой крысы и в целом по группе; 2) при использовании в качестве функции отношения числа РИ к числу совершенных попыток вычисляли критерий 50%-ной обученности (ОБ-50) с доверительным интервалом (число попыток до появления 50% РИ в среднем у каждой крысы в группе).

Тестирование проводили отдельно для групп самок и самцов. Повторное тестирование проводили через 2 сут.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием ряда методов параметрической (критерий *t* Стьюдента и дисперсионный критерий Фишера) и непараметрической (медианный критерий χ^2 , критерий Х – Ван дер Вардена, критерий *U* – Вилкоксона – Манна – Уитни) статистики. Значимость различий считалась достаточной, если $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что хроническое немодулированное электромагнитное излучение не оказывает существенного влияния на течение и исход беременности самок и раннее постнатальное развитие их потомства первого поколения [18].

В табл. 1 приведены показатели условно-рефлекторной деятельности потомства первого поколения крыс, подвергнутых хроническому воздействию ЭМИ диапазона мобильной связи, по результатам первого и второго тестирования. Из данных, представленных в таблице, видно, что по всем показателям условно-рефлекторной деятельности самцы из подопытной группы не отличаются от контрольных животных. Это говорит о том, что способность к обучению, кратковременная и долговременная память у этих животных не нарушены и соответствуют уровню контроля. Статистически значимое различие с контрольными животными во втором тестировании по показате-

Таблица 1. Интегративные и скоростные показатели условно-рефлекторной деятельности потомства первого поколения крыс после хронического воздействия ЭМИ**Table 1.** Integrative and speed indicators of conditioned reflex activity of the offspring of the first generation of rats after chronic exposure to EMR

Группа (число животных)	Лаг-фаза	Общее количество УРАИ	Количество отказов	Латентный период УРАИ, с	Латентный период перебежек, с	ОБ-50	Количество попыток до первой серии РИ
1-е тестирование							
Контроль ♂ (n = 27)	10.7 ± 1.5	16.0 ± 1.4	2.2 ± 0.4	2.40 ± 0.05	5.94 ± 0.06	74.6 ± 4.3	31.8 ± 6.0
Опыт ♂ (n = 29)	13.0 ± 1.8	17.6 ± 1.8	3.8 ± 1.0	2.28 ± 0.05	5.90 ± 0.06	68.6 ± 2.4	32.0 ± 3.8
Контроль ♀ (n = 23)	11.1 ± 2.2	23.1 ± 2.1	2.0 ± 0.5	1.86 ± 0.04	5.86 ± 0.07	52.2 ± 4.3	25.4 ± 3.8
Опыт ♀ (n = 28)	13.6 ± 1.2	19.3 ± 1.6	2.0 ± 0.4	2.24 ± 0.04	5.83 ± 0.06	60.8 ± 1.4*	32.4 ± 3.4
2-е тестирование							
Контроль ♂ (n = 27)	2.2 ± 0.7	34.3 ± 1.9	1.9 ± 1.0	2.36 ± 0.03	5.60 ± 0.09	20.4 ± 1.2	16.8 ± 2.7
Опыт ♂ (n = 29)	2.6 ± 0.5	34.5 ± 1.6	2.3 ± 0.9	2.24 ± 0.03*	5.37 ± 0.07	23.5 ± 1.2	19.1 ± 2.3
Контроль ♀ (n = 23)	2.0 ± 0.4	40.4 ± 1.0	0.3 ± 0.1	1.00 ± 0.03	5.34 ± 0.10	-13.6 ± 1.7	9.6 ± 1.3
Опыт ♀ (n = 28)	4.3 ± 1.0*	36.2 ± 1.6	1.0 ± 0.4	2.03 ± 0.03*	5.27 ± 0.06	15.5 ± 0.9*	15.6 ± 2.4*

* Статистически значимое различие с контролем при $p < 0.05$.

лю латентного периода условного рефлекса активного избегания (УРАИ) может свидетельствовать лишь о некотором повышении возбужденности подопытных животных, так как интервал между условным раздражителем и выполнением УРАИ у них несколько короче, чем у контрольных животных. На рис. 1 приведен график нарастания числа УРАИ по попыткам по результатам второго тестирования. И тут мы видим, что самцы подопытной группы “работают” на уровне контрольных животных.

При анализе показателей условно-рефлекторной деятельности самок подопытной группы удалось выявить статистически значимое различие с контролем по нескольким позициям. По результатам первого тестирования у самок подопытной группы показатель ОБ-50 выше, чем у контрольных животных, т.е. скорость обучения у этих животных снижена. Это говорит о том, что животным требуется большее количество предъявлений условного и безусловного раздражителей для формирования уровня обученности, равного контролю. Анализируя результаты второго тестирования, нужно обратить внимание на то, что в подопытной группе самок сохраняется снижение скорости обучения. Лаг-фаза (число попыток до

появления первой РИ) у самок подопытной группы выше, чем у контрольных животных, и значительно больше показатель ОБ-50. Следует также отметить, что при втором тестировании самкам подопытной группы требовалось значительно больше попыток для появления серий из пяти и более РИ подряд, т.е. у них хуже, чем у контрольных животных, запоминалась связь между условным и безусловным раздражителем.

Применение регрессионного анализа позволило выявить у подопытных самок статистически значимое различие с контролем по коэффициенту регрессии А при втором тестировании, что свидетельствует о нарушении у этих животных долговременной памяти, т.е. они хуже запомнили “урок” первого тестирования (коэффициент А у контроля равен 73.4 ± 1.7 , у подопытной группы = 51.9 ± 2.0). Но при этом к концу сессии результативность обучения животных из опытной и контрольной группы не различалась из-за более высокой скорости обучения у подопытных самок.

Через 21 день после первого тестирования нами было проведено третье тестирование у самок, чтобы оценить, насколько долго сохраняется эффект ЭМИ. Все показатели, кроме ОБ-50 и коли-

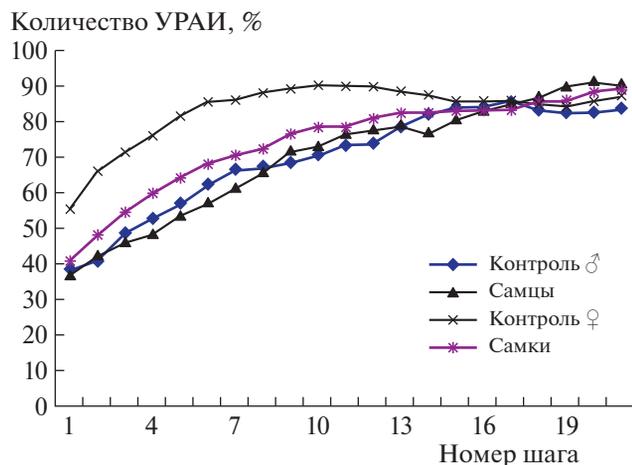


Рис. 1. Нарастание процента УРАИ по попыткам по результатам второго тестирования потомства первого поколения облученных крыс.

Fig. 1. The increase in the percentage of URAI by attempts according to the results of the second testing of the offspring of the first generation of irradiated rats.

чества попыток до первой серии РИ, соответствовали показателям контроля. Однако ОБ-50 у самок подопытной группы был достоверно выше, чем у самок контрольной группы (-21.1 ± 3.6 у контрольных крыс против 4.6 ± 0.3 у подопытных крыс). Подопытным крысам также требовалось больше сочетаний условного и безусловного стимулов для появления серийности в ответах (9.0 ± 1.8 попыток у контрольных крыс до появления первой серии РИ против 14.9 ± 2.7 у подопытных). Таким образом, эффект ЭМИ сохранялся у облученных самок, по крайней мере, в течение трех недель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы попытались оценить влияние длительного воздействия немодулированного ЭМИ на условно-рефлекторную деятельность потомства облученных родителей-крыс. Ранее в нашей лаборатории оценивали влияние импульсно-модулированного ЭМИ на различные аспекты поведения антенатально облученных животных. Так, было показано, что у потомства первого поколения, облученного *in utero*, снижена физическая выносливость то тесту бега в тредбане до полного утомления, снижена двигательная активность по тесту “открытое поле”, нарушена выработка условных рефлексов [19]. Другие авторы при использовании различных способов тестирования когнитивных функций также продемонстрировали негативные эффекты импульсного ЭМИ на двигательную активность, обучаемость, память, электрофизиологические показатели деятельности мозга [20, 21].

Однако выявленные нами нарушения проявляются только у самок первого поколения. У самцов первого поколения отклонений от контрольных животных по показателям условно-рефлекторной деятельности в наших экспериментах выявлено не было. Гендерные различия в эффектах ЭМИ были отмечены и другими авторами. Так, у крыс негативные последствия ЭМИ были более выражены у внутриутробно облученных самок [19], тогда как у мышей сильнее на воздействии ЭМИ реагировали самцы [20].

В результате проведенной работы можно сделать вывод о том, что длительное воздействие немодулированного ЭМИ, близкого по несущей частоте к параметрам мобильной связи, может негативно сказываться на функциональном состоянии ЦНС потомства облученных животных, что выражается, в данном случае, в нарушении условно-рефлекторной деятельности и нарушении кратковременной и долговременной памяти животных.

Результаты данной работы обобщены и зарегистрированы в реестре баз данных Роспатент [22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Web Canapé. Статистика интернета 2017–2018 годов в мире и в России. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.web-canape.ru/business/internet-2017-2018-v-mire-i-v-rossii-statistika-i-trendy/> Дата обращения 16.04.2020 г.
2. Рыбалко С.Ю., Грецкий И.А., Бобрик Ю.В. и др. Медико-биологические аспекты воздействия электромагнитного излучения мобильного телефона // Крымский журн. эксперим. и клин. медицины. 2011. № 1–1. С. 118–124. [Rybalco S.Yu., Greckij I.A., Bobrik Yu.V. et al. Mediko-biologicheskie aspekty vozdejstviya elektromagnitnogo izlucheniya mobil'nogo telefona // Krymskij zhurnal eksperimental'noj i klinicheskoy mediciny. 2011. № 1–1. S. 118–124. (In Russian)]
3. Семенова Н.В., Денисов А.П., Денисова О.А. и др. Влияние электромагнитного излучения от сотовых телефонов на здоровье детей и подростков (обзор литературы) // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исследований. 2016. № 6. Ч. 4. С. 701–705. [Semenova N.V., Denisov A.P., Denisova O.A. et al. Vliyanie elektromagnitnogo izlucheniya ot sotovyh telefonov na zdorov'e detej i podrostkov (obzor literatury) // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2016. № 6. Ch. 4. S. 701–705. (In Russian)]
4. Вершинин А.В., Авдонина Л.А. Влияние сотовых телефонов на здоровье человека // Вестн. Пензенского гос. ун-та. 2015. № 3 (11). С. 175–179. [Verшинin A.V., Avdonina L.A. Vliyanie sotovyh telefonov na zdorov'e cheloveka // Vestnik Penzenskogo gosudarstvennogo universiteta. 2015. № 3 (11). S. 175–179. (In Russian)]
5. Прохорова А.И. Влияние мобильного телефона на здоровье человека // Междунар. науч. журн. “Инновационная наука”. 2018. № 1. С. 16–17. [Prohorova A.I.

- Vliyanie mobil'nogo telefona na zdorov'e cheloveka // *Mezhdunarodnyj nauchnyj zhurnal "Innovacionnaya nauka"*. 2018. № 1. S. 16–17. (In Russian)]
6. *Мясникова О.С.* Социально-экологические риски от электромагнитного воздействия сотовой связи на детей // *Вестн. Саратовского гос. соц.-экон. ун-та*. 2009. № 3 (27). С. 118–121. [*Myasnikova O.S.* Social'no-ekologicheskie riski ot elektromagnitnogo vozdeystviya sotovoj svyazi na detej // *Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo social'no-ekonomicheskogo universiteta*. 2009. № 3 (27). S. 118–121. (In Russian)]
 7. *Васильева Т.И., Сарокваша О.Ю.* Влияние электромагнитного поля сотового телефона на организм человека в зависимости от возраста // *Вестн. Самарского гос. ун-та*. 2012. № 3/2 (94). С. 29–36. [*Vasil'eva T.I., Sarokvasha O.Yu.* Vliyanie elektromagnitnogo polya sotovogo telefona na organizm cheloveka v zavisimosti ot vozrasta // *Vestnik Samarskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012. № 3/2 (94). S. 29–36. (In Russian)]
 8. *Чуешова Н.В., Висмонт Ф.И.* Влияние длительного воздействия электромагнитного излучения частоты мобильного телефона на морфофункциональное состояние репродуктивной системы крыс-самцов и их потомства // *Докл. Нац. академии наук Беларуси*. 2019. Т. 63. № 2. С. 198–206. [*Chuyeshova N.V., Vismont F.I.* Vliyaniye dlitel'nogo vozdeystviya elektromagnitnogo izlucheniya chastoty mobil'nogo telefona na morfofunktsional'noye sostoyaniye reproduktivnoy sistemy krys-samtsov i ikh potomstva // *Doklady Natsional'noy akademii nauk Belarusi*. 2019. T. 63. № 2. S. 198–206. (In Russian)]
 9. *Овчинникова А.В., Шилкова Т.В., Шибкова Д.З.* Воздействие электромагнитного излучения на репродуктивную функцию экспериментальных животных и их потомство // *Сб. тр. конф. "Актуальные проблемы экологии и природопользования"*. 2014. Вып. 16. С. 352–355. [*Ovchinnikova A.V., Shilkova T.V., Shibkova D.Z.* Vozdeystvie elektromagnitnogo izlucheniya na reproduktivnyuyu funktsiyu eksperimental'nykh zhiivotnykh i ikh potomstvo // *Sbornik trudov konferencii "Aktual'nye problemy ekologii i prirodopol'zovaniya"*. 2014. Vyp. 16. S. 352–355. (In Russian)]
 10. *Григорьев Ю.Г., Григорьев О.А.* Сотовая связь и здоровье: электромагнитная обстановка, радиобиологические и гигиенические проблемы, прогноз опасности. М.: Экономика, 2016. 567 с. [*Grigor'ev Yu.G., Grigor'ev O.A.* Sotovaya svyaz' i zdorov'e: elektromagnitnaya obstanovka, radiobiologicheskie i gigienicheskie problemy, prognoz opasnosti. M.: Ekonomika, 2016. 567 s. (In Russian)]
 11. *Hosking B.* Preliminary report: symptoms associated with mobile phone use / *B. Hosking* // *Occup. Med.* 1998. V. 6. № 48. P. 357–360.
 12. *Лукьянова С.Н.* Электромагнитное поле СВЧ диапазона нетепловой интенсивности как раздражитель для центральной нервной системы. М.: ФМБЦ им. А.И.Бурназяна, ФМБА России, 2015. 200 с. [*Luk'yanova S.N.* Elektromagnitnoye pole SVCh diapazona neteplovoj intensivnosti kak razdrazhitel' dlya central'noj nervnoj sistemy. M.: FMBC im. A.I. Burnazyana, FMBA Rossii, 2015. 200 s. (In Russian)]
 13. *Хорсева Н.И., Григорьев Ю.Г., Горбунова Н.В.* Психофизиологические показатели детей-пользователей мобильной связью. Сообщение 2. Результаты четырехлетнего мониторинга // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011. Т. 51. № 5. С. 617–623. [*Horseva N.I., Grigor'ev Yu.G., Gorbunova N.V.* Psihofiziologicheskie pokazateli detej-pol'zovatelej mobil'noj svyaz'yu. Soobshchenie 2. Rezul'taty chetyryohletnego monitoringa // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2011. V. 51. № 5. S. 617–623. (In Russian)]
 14. *Григорьев Ю.Г., Степанов В.С.* Формирование памяти (импринтинга) у цыплят после предварительного воздействия ЭМП низких уровней // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1998. Т. 38. № 2. С. 223–231. [*Grigor'ev Yu.G., Stepanov V.S.* Formirovaniye pamyati (imprintinga) u cyplyat posle predvaritel'nogo vozdeystviya EMP nizkikh urovnej // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 1998. V. 38. № 2. S. 223–231. (In Russian)]
 15. *Никитина В.Н., Ляшко Г.Г., Шапошникова Е.С., Тухомова Г.Н.* Исследование в хроническом эксперименте биоэффектов СВЧ-излучений судовых навигационных радиолокаторов // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2003. Т. 43. № 5. С. 538–540. [*Nikitina V.N., Lyashko G.G., Shaposhnikova E.S., Tihomova G.N.* Issledovanie v hronicheskom eksperimente bioeffektov SVCh-izlucheniya sudovykh navigatsionnykh radiolokatorov // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2003. V. 43. № 5. S. 538–540. (In Russian)]
 16. *Жаворонков Л.П., Дубовик Б.В., Павлова Л.Н. и др.* Влияние широкополосного импульсно-модулированного ЭМП низкой интенсивности на общую возбудимость ЦНС // *Радиация и риск*. 2011. Т. 20. № 2. С. 64–74. [*Zhavoronkov L.P., Dubovik B.V., Pavlova L.N. et al.* Vliyanie shirokopolosnogo impul'snomodulirovannogo EMP nizkoj intensivnosti na obshchuyu vozbudimost' CNS // *Radiatsiya i risk*. 2011. V. 20. № 2. S. 64–74. (In Russian)]
 17. *Панфилова В.В., Колганова О.И., Жаворонков Л.П. и др.* Психофизиологическое развитие первого и второго поколений самцов крыс, облученных в дозе 1.5 Гр // *Радиация и риск*. 2013. Т. 22. № 2. С. 101–109. [*Panfilova V.V., Kolganova O.I., Zhavoronkov L.P. et al.* Psihofiziologicheskoye razvitiye pervogo i vtorogo pokoleniy samtsov krys, obluchennykh v doze 1.5 Gr // *Radiatsiya i risk / Radiation and Risk*. 2013. V. 22. № 2. P. 101–109. (In Russian)]
 18. *Панфилова В.В., Колганова О.И., Чибисова О.Ф.* Влияние хронического воздействия излучений диапазона средств мобильной связи на ранний постнатальный онтогенез потомства // *Сб. докл. Конф. "Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений"*, Москва, 12–13 ноября 2019 г. М., 2019. С. 138–139. [*Panfilova V.V., Kolganova O.I., Chibisova O.F.* Vliyanie hronicheskogo vozdeystviya izlucheniya diapazona sredstv mobil'noj svyazi na rannij postnatal'nyy ontogenez potomstva // *Sbornik dokladov konferencii "Aktual'nye problemy radiobiologii i gigieny neioniziruyushchih izlucheniya"*, Moskva, 12–13 noyabrya 2019 g. M., 2019. S. 138–139. (In Russian)]
 19. *Изместьева О.С., Павлова Л.Н., Жаворонков Л.П.* Экспериментальная оценка последствий хрониче-

- ского воздействия электромагнитного излучения диапазона мобильной связи в антенатальном периоде развития крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 1. С. 63–70. [*Izvest'yeva O.S., Pavlova L.N., Zhavoronkov L.P. Eksperimental'naya otsenka posledstviy khronicheskogo vozdeystviya elektromagnitnogo izlucheniya diapazona mobil'noy svyazi v antenatal'nom periode razvitiya krysov // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 2020. T. 60. № 1. S. 63–70. (In Russian)*]
20. *Yanchun Zhang, Zhihui Li, Yan Gao, Chenggang Zhang. Effects of fetal microwave radiation exposure on offspring behavior in mice // J. Radiat. Res. 2015. V. 56. № 2. P. 261–268.*
21. *Moazamehosadat Razavinasab, Karsa Moazzami, Mohammad Shabani. Maternal mobile phone exposure alters intrinsic electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons in rat offspring // Toxicol. Ind. Health. 2016. V. 32. № 6. P. 968–979.*
22. *Панфилова В.В., Колганова О.И., Чибисова О.Ф. Показатели обучаемости потомства крыс Вистар, подверженных хроническому воздействию электромагнитного излучения диапазона средств мобильной связи: Свидетельство о регистрации базы данных № 2020620327 от 19.02.2020. [Panfilova V.V., Kolganova O.I., Chibisova O.F. Pokazateli obuchayemosti potomstva krysov Vistar, podverzhennykh khronicheskomu vozdeystviyu elektromagnitnogo izlucheniya diapazona sredstv mobil'noy svyazi: Svidetel'stvo o registratsii bazy dannykh № 2020620327 ot 19.02.2020. (In Russian)].*

Analysis of the Results of the Prolonged Influence of EMP on the Cognitive Functions of the Progeny of Irradiated Rats

V. V. Panfilova^{a, #}, O. I. Kolganova^a, and O. F. Chibisova^a

^a *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: whiskas04@yandex.ru*

The article shows the results of experimental work to assess the psychophysiological status of the offspring of the first generation of Wistar rats, which were exposed to prolonged electromagnetic radiation in the mobile range. Irradiation conditions: carrier frequency 1800 MHz, the zone of the formed wave, EFD 85 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, the distance from the radiation source 1.3 m, 1 hour per day. Males and females were irradiated 18 days before mating, then females were irradiated from 5 to 17 days of pregnancy. The cognitive (memorable) functions of the brain of offspring were evaluated by their ability to develop and reproduce the conditioned reflex of active avoidance (CRAA). In males of the first generation, deviations in conditioned reflex activity were not detected. In females of the first generation, a decrease in the learning rate and a damage of long-term memory were found.

Keywords: Wistar rats, offspring, conditioned reflex activity, electromagnetic radiation, mobile communications, anechoic chamber

РАДИОБИОЛОГИЯ
РАСТЕНИЙ

УДК 635.25:581.14:57.084:539.1.047

ДЕЙСТВИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ПАРАМЕТРЫ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН ЛУКА *Allium cepa*
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

© 2021 г. А. В. Зуева^{1,*}, Е. А. Трофимова¹, Д. В. Дементьев¹, А. Я. Болсуновский¹

¹ Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”,
Красноярск, Россия

*E-mail: an.v.zueva@ya.ru

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 02.09.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Изучена реакция проростков семян лука (*Allium cepa* L.) на воздействие γ -излучения в диапазоне малых доз (от 10 до 140 мГр) по ростовым и цитогенетическим параметрам при разной длительности воздействия (24 и 48 ч облучения). Наиболее чувствительными параметрами к γ -излучению являются частота встречаемости аномальных клеток и микроядер, которые достоверно отличаются от контроля при минимальных дозах 20 и 70 мГр соответственно. Количество клеток с микроядрами и хромосомными аберрациями возрастало линейно с увеличением поглощенной дозы, но для частоты микроядер выявлены отличия при разных временах облучения. Для образования хромосомных аберраций основным фактором является доза облучения, в то время как для выхода микроядер длительность воздействия также становится главным фактором наряду с дозовым эффектом. Проведено ранжирование параметров биотеста в отношении малых доз γ -излучения.

Ключевые слова: *Allium*-тест, проростки семян, γ -излучение, аномалии митоза, хромосомные аберрации, митотический индекс, микроядра, дозовая зависимость, малые дозы

DOI: 10.31857/S0869803121020156

Испытания ядерного оружия и развитие атомной энергетики (включая аварии на АЭС) привели к поступлению техногенных радионуклидов в окружающую среду. В районах радиоактивного загрязнения живые организмы и население обычно подвергаются хроническому облучению малыми дозами ионизирующего излучения. Негативный эффект малых доз радиации (менее 200 мГр по данным UNSCEAR 2006 [1]) базируется на линейной беспороговой концепции (ЛБК). Составляя основу стандартов радиационной защиты, ЛБК предполагает экстраполяцию биологических эффектов ионизирующего излучения высоких доз на низкие [2, 3]. Открытие таких явлений, как эффект гиперрадиочувствительности, эффект свидетеля, адаптивный ответ и гормезис поставили под сомнение правомерность использования ЛБК для оценки радиационных рисков. Накопление данных о действии радиации на объекты живой природы показало, что зависимость доза–эффект на самом деле имеет сложный и неоднозначный характер. Объекты радиобиологических исследований (клетки растений и животных), а также их параметры, используемые в качестве индикаторов радиационного воздействия (ростовые показатели, пролиферативная активность, цитогенетические нарушения), имеют разную

чувствительность к ионизирующему излучению, которая, в свою очередь, по-разному проявляется на различных отрезках дозовых величин [2–7].

Луковый тест (*Allium* test) традиционно используется для оценки токсичности факторов различной природы, включая действие ионизирующего излучения [8, 9]. В экспериментах используются как луковицы, так и семена этого растения [10, 11]. К одним из основных преимуществ лукового биотеста относится разнообразие показателей, используемых для оценки степени воздействия негативного фактора, представляющих собой разные уровни организации живой материи: от клеточного до организменного.

Результаты исследований по оценке влияния ионизирующего излучения в области малых доз на систему лукового и других растительных биотестов неоднозначны [6, 7, 10–14] и обуславливаются стохастическим характером действия изучаемого фактора на молекулярном уровне, определяя отсутствие четкой дозовой зависимости [6, 15]. В работе S.A. Geras'kin и соавт. [6] облучение проросших семян ячменя проводили γ -источником ¹³⁷Cs при мощности дозы 500 мГр/ч. Кратковременное (от 6 мин до 2 ч) облучение семян таким источником в диапазоне малых доз от 50 до

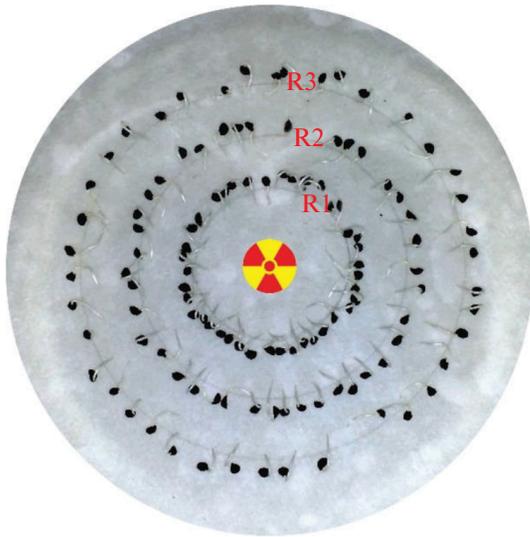


Рис. 1. Схема эксперимента по облучению проростков семян лука источником ^{137}Cs . Проростки размещали на расстоянии 2 см (R1), 3.5 см (R2) и 5 см (R3) от центра радиоактивного источника.

Fig. 1. The experimental scheme on irradiation of onion seed seedlings with a ^{137}Cs source. The seedlings were placed at a distance of 2 cm (R1), 3.5 cm (R2) and 5 cm (R3) from the center of the radioactive source.

1000 мГр привело к повышению уровня клеток с хромосомными нарушениями. В работе А.У. Volsupovsky и соавт. [14] облучение проростков семян лука проводили 24 ч при мощности дозы облучения, более чем на два порядка ниже (до 4.2 мГр/ч). Облучение проростков семян лука в малых дозах (50 и 100 мГр) при таких условиях также привело к достоверному возрастанию уровня хромосомных нарушений в клетках по сравнению с контролем [14]. Других работ по оценке эффектов облучения семян малыми дозами, но разной длительностью, нам неизвестно. Однако в работе S.A. Geras'kin и соавт. [16] кратковременное облучение семян ячменя разными мощностями доз и, следовательно, разной длительностью, приводило к разным эффектам роста корней, несмотря на одинаковую поглощенную дозу (10–20 Гр).

Известно, что облучение клеток на начальных стадиях клеточного цикла (первые 16 ч у лука) приводит к возникновению хромосомных нарушений в процессе деления клетки [17, 18]. Поэтому при увеличении длительности воздействия следовало бы ожидать увеличения количества аномальных клеток. Но, с другой стороны, запускаемые в ответ на воздействие процессы репарации призваны нивелировать негативные эффекты.

Цель настоящей работы – оценить действие γ -излучения разной длительности в малых дозах на ростовые и цитогенетические показатели корневой меристемы проростков семян лука *Allium cepa*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В эксперименте использовали семена репчатого лука (*Allium cepa* L.) ($2n = 16$) сорта “Штутгартер ризен”. Перед началом эксперимента семена выдерживали в течение 14 сут при температуре 4°C для активации и синхронизации процесса прорастания и одновременного вступления в митоз большего числа клеток. Семена лука проращивали в полипропиленовых контейнерах на фильтровальной бумаге, смоченной в дистиллированной воде, в темноте при комнатной температуре. Всхожесть семян оценивали на 7-й день проращивания по ГОСТ 12038-84 [19], и она составляла 88%. Для облучения использовали проростки с длиной первичного корня – 3 мм.

На рис. 1 приведена схема эксперимента по облучению проростков семян лука источником ^{137}Cs с активностью 12 МБк. Ранее эту схему использовали в экспериментах по облучению побегов растения *Elodea canadensis* [20]. Проростки семян лука размещали на расстоянии 2 см (уровень R1), 3.5 см (уровень R2) и 5 см (уровень R3) от центра радиоактивного источника. Значения мощности дозы определялись расстоянием проростков от источника и были проверены прямыми измерениями дозиметром ДКГ-02У (НПП “Доза”, Россия). Значения мощности дозы для уровней облучения R3, R2 и R1 были равны 0.4, 0.8 и 2.9 мГр/ч соответственно. При этом поглощенные дозы составляли 10 мГр (уровень R3), 20 мГр (уровень R2), 70 мГр (уровень R1) для 24 ч облучения и 20 мГр (R3), 40 мГр (R2), 140 мГр (R1) для 48 ч. Поглощенная доза в контроле (К) – около 0.01 мГр.

Для каждого уровня облучения (R1, R2, R3) и контроля (К) было отобрано по 40 проростков. Пророщенные семена размещали в кристаллизаторе на двух слоях фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. Облучение проводили в инкубаторе Sanyo MIR-254 (Panasonic, Япония) в темноте при температуре 21°C в течение 24 и 48 ч. Контролем служили необлученные проростки, которые культивировались в идентичных с облученными проростками условиях. Через 24 ч из каждого уровня облучения и контроля, случайным образом, отбирали по 20 штук проростков и фиксировали в уксусном спирте. Спустя следующие 24 ч (общее время экспозиции 48 ч) процедуру повторяли с оставшимися проростками.

В качестве индикаторов радиационного повреждения использовали следующие параметры: длину корней, митотический и фазовые индексы (доля клеток, находящихся на разных стадиях митоза), микроядерный индекс, долю аномальных клеток с различными типами нарушений на стадии ана-телофазы митоза.

Сразу после облучения корни фиксировали в уксусном спирте (3 : 1) в течение 24 ч, затем по-

мещали в 1%-ный ацетоорсеин на 24 ч. Окрашенные корни дважды промывали в 45%-ном растворе уксусной кислоты от избытка красителя, мацерировали в том же растворе при температуре 60°C в течение 10 мин. После измерения длины корня меристему отделяли скальпелем и готовили давленный микропрепарат.

Учет цитогенетических параметров проводили при помощи светового микроскопа (Olympus CX31). Подсчет митотического индекса (МИ) и числа микроядер (МЯ) проводили на фотографиях полей зрения при помощи программы ImageJ 1.46r: Cell counter plugin [21]; просматривали 5 слайдов на каждый уровень облучения (2000–3000 клеток на уровень облучения, от 500 клеток на препарат, в среднем 600 клеток).

Для учета аномалий митоза было просмотрено от 12 до 20 препаратов (от 1100 до 1800 клеток на каждый уровень облучения). Отмечались следующие типы аномалий: фрагменты и мосты (одинарные, двойные и множественные), блуждающие хромосомы, множественные нарушения (наличие в клетке нескольких нарушений разных типов). К “прочим” аномалиям относили микроядра и их потенциальные предшественники (фрагменты хроматина нестандартной конфигурации).

Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2013. Статистический анализ проводили с использованием программы PAST 3.23 [22].

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовали критерий Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий между группами для параметров с нормальным распределением значений в выборках “длина корня” и “митотический индекс” оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (F -критерий), для параметров “микроядерный индекс” и “частота аберрантных клеток”, распределение выборочных значений которых не соответствовало нормальному, – при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (H -критерий). В случае обнаружения статистически значимых различий между группами дополнительно проводили сравнение совокупностей попарно при помощи апостериорного критерия Тьюки или критерия Данна соответственно. Сравнение временных и дозовых эффектов проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (F -критерий). Для сравнения углов наклона дозовых зависимостей применяли ковариационный анализ (F -критерий). На рисунках и в таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В проведенных экспериментах длительностью облучения 24 ч длины корней семян лука, находившихся на разных уровнях облучения и в контроле, достоверно между собой не отличались ($F = 1.76$, $p = 0.16$). Угнетение роста корней наблюдалось только при облучении проростков, расположенных ближе всего к источнику ионизирующего излучения (уровень R1, 48 ч), что соответствовало поглощенной дозе 140 мГр ($F = 3.61$, $p = 0.02$) (табл. 1).

Значения митотического индекса (МИ) при всех уровнях облучения разной длительностью изменялись в диапазоне от 6.5 до 9.3, в контроле значения МИ были 7.9 и 7.1% для 24 и 48 ч роста соответственно (табл. 1). В результате двухфакторного дисперсионного анализа было показано, что факторы времени и мощности дозы облучения (удаленности от источника) на величину митотического индекса не влияют. Однако в целом нельзя не заметить тенденцию, хотя и статистически не достоверную, к снижению пролиферативной активности с течением времени (табл. 1).

Рассмотрение фазовых индексов показало, что при облучении проростков семян лука, находившихся на первом уровне облучения (R1) в течение 48 ч, доля клеток, вступивших в стадию профазы больше, чем в соответствующем контроле ($F = 3.18$, $p = 0.05$). Значения остальных индексов (доля клеток на стадиях мета-, ана- и телофазы) друг от друга существенно не отличались (табл. 1).

Количество микроядерных клеток (МЯ) корневой меристемы облученных семян лука, находившихся на первом уровне облучения (R1) в течение 24 ч ($H = 11.58$, $p = 0.008$) и 48 ч ($H = 13.92$, $p = 0.002$), значительно выше, чем в контроле (табл. 2). Была выявлена тенденция к увеличению доли клеток с числом микроядер больше одного ($МЯ > 1$) в корешках семян, находящихся на первых экспозиционных уровнях ($H = 9.63$, $p = 0.009$ и $H = 6.14$, $p = 0.014$ для 24 и 48 ч облучения соответственно). Также наблюдалось снижение количества микроядер с увеличением времени облучения ($F = 6.49$, $p = 0.015$). Так, микроядерный индекс в 48-часовом контроле ниже в 2 раза, чем в 24-часовом. Разница на первом (R1) и втором (R2) экспозиционных уровнях несколько меньше, однако клетки с числом микроядер больше одного ($МЯ > 1$) после 48 ч облучения исчезают или их доля существенно снижается (табл. 2).

Доля аберрантных клеток на первом (R1) и втором (R2) уровнях облучения достоверно превышала контрольный (К) показатель ($H = 44.17$ и $H = 49.93$, $p < 0.05$) как для 24, так и 48 ч облучения (табл. 3). Однако, в отличие от микроядер (табл. 2), с увеличением длительности облучения число аберрантных клеток на первом и втором уровнях облучения увеличивается ($F = 9.45$, $p = 0.002$). Так, в корневой меристеме семян лука, находив-

Таблица 1. Влияние γ -излучения на рост корней семян лука и митотическую активность клеток при разной длительности облучения**Table 1.** The influence of γ -radiation on the onion seed roots growth and mitotic activity of cells for different duration of irradiation (T , h)

T , ч	Уровень облучения	Доза, мГр	Длина корней, мм	Профаза %	Метафаза %	Анафаза %	Телофаза %	МИ %
24	К	0.01	9.9 ± 1.7	5.0 ± 0.7	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.3	7.9 ± 0.7
	R3	10	11.0 ± 2.3	3.6 ± 0.6	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.8 ± 0.2	7.3 ± 1.0
	R2	20	9.8 ± 1.9	4.3 ± 0.7	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.3	8.1 ± 0.8
	R1	70	9.9 ± 1.3	5.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.2	9.3 ± 0.6
48	К	0.01	21.2 ± 3.2	2.8 ± 0.4	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2	2.4 ± 0.4	7.1 ± 0.9
	R3	20	20.0 ± 4.0	3.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.4	6.5 ± 0.7
	R2	40	20.3 ± 3.5	3.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.8 ± 0.1	7.6 ± 0.8
	R1	140	17.6 ± 3.4*	4.8 ± 0.7*	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.3	8.4 ± 0.9

* Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).**Таблица 2.** Влияние γ -излучения на индукцию формирования микроядер (МЯ) в клетках на стадии интерфазы при разной длительности облучения**Table 2.** The influence of γ -radiation on the micronuclei induction in the interphase cells for different duration of irradiation (T , h)

T , ч	Уровень облучения	Доза, мГр	Число интерфазных клеток	МЯ, %	МЯ > 1, %
24	К	0.01	2751	0.6 ± 0.4	0.04 ± 0.1
	R3	10	2764	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
	R2	20	2761	1.2 ± 0.4	0.1 ± 0.1
	R1	70	2671	5.3 ± 0.5*	0.7 ± 0.1*
48	К	0.01	2705	0.3 ± 0.1	0.04 ± 0.1
	R3	20	2652	0.5 ± 0.1	0
	R2	40	2737	0.8 ± 0.2	0
	R1	140	2838	4.3 ± 0.7*	0.4 ± 0.2*

* Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).

шихся на первом экспозиционном уровне (R1) в течение 48 ч, доля aberrantных клеток в 2 раза больше (26.8%), чем при облучении в течение 24 ч – 13.1% (табл. 3). В данном случае это может быть объяснено эффектом увеличения поглощенной дозы облучения.

Вклад в формирование общей доли аномальных делений при облучении в основном вносил такой тип нарушений, как фрагменты, который достоверно отличался от контроля почти на всех уровнях облучения (табл. 3). Другие типы нарушений (мосты, множественные нарушения, блуждающие хромосомы и прочие) достоверно отличались от контроля только на первом уровне (R1), как при 24, так и 48 ч облучения. Таким образом, в диапазоне малых доз γ -излучения от 20 до 140 мГр общая доля аномальных делений в клетках (или отдельных типов нарушений) достоверно превышала контрольный уровень (табл. 3).

На рис. 2 представлены дозовые зависимости клеток с частотой аномальных митозов (а) и микроядер (б). Для обоих параметров зависимость имеет линейный характер, однако углы наклона 24 и 48-часовых дозовых зависимостей частоты микроядер различаются ($F = 49.2$, $p < 0.05$), в то время как для частоты клеток с нарушениями таких различий не наблюдается ($F = 0.03$, $p = 0.95$). Из всего вышеизложенного следует, что для параметра “частота микроядер” фактор времени (длительность облучения) имеет первостепенное значение, в сравнении с мощностью дозы облучения (удаленности от источника излучения).

ОБСУЖДЕНИЕ

Корни растений являются удобными объектами для изучения влияния факторов различной природы, в том числе и радиации. Это связано с

Таблица 3. Влияние γ -излучения на возникновение аномальных делений в клетках на стадии ана-телофазы при разной длительности облучения

Table 3. The influence of γ -radiation on the induction of abnormal cell divisions at the ana-telophase stage for different duration of irradiation (T , h)

T , ч	Уровень облучения	Доза, мГр	Аберрантные клетки, %	Аберрантные клетки с нарушениями разных типов, %				
				фрагменты	мосты	блуждающие хромосомы	прочие	множественные
24	К	0.01	1.2 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
	R3	10	3.0 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	$0.9 \pm 0.2^*$	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
	R2	20	$3.3 \pm 0.6^*$	$1.4 \pm 0.3^*$	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
	R1	70	$13.1 \pm 1.5^*$	$7.2 \pm 0.9^*$	1.0 ± 0.3	$1.8 \pm 0.5^*$	$1.1 \pm 0.3^*$	$2.0 \pm 0.4^*$
48	К	0.01	1.0 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1
	R3	20	$3.0 \pm 0.4^*$	$1.4 \pm 0.3^*$	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1
	R2	40	$4.8 \pm 0.8^*$	$1.5 \pm 0.4^*$	1.4 ± 0.6	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2
	R1	140	$26.8 \pm 4.4^*$	$12.1 \pm 1.9^*$	$2.0 \pm 0.4^*$	$3.8 \pm 0.8^*$	$2.0 \pm 0.5^*$	$6.9 \pm 2.3^*$

* Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).

рядом отличительных особенностей этого органа, например, таких, как интенсивная пролиферация и раннее начало роста. Рост корня обуславливается тремя основными процессами: 1 – пролиферация клеток корневой меристемы, 2 – переход клеток корневой меристемы к растяжению и 3 – собственно рост клеток в зоне растяжения [23]. Все три процесса взаимосвязаны и являются ключевыми для понимания воздействия радиационного фактора на динамику ростовых процессов в корнях.

В проведенном нами эксперименте было зарегистрировано угнетение роста корней семян лука только при максимальной поглощенной дозе 140 мГр (48 ч облучения). В наших предыдущих работах с облучением проростков семян лука в

диапазоне доз от 20 до 13000 мГр в течение 24 ч статистически значимого эффекта на длину корней обнаружено не было [14]. Но было показано угнетение ростовых параметров проростков при дозе 100 мГр на 6-е сутки после облучения [13]. В работе S.G. Vajipurkar и соавт. [24] угнетения роста корней лукович не регистрировали при дозах менее 5000 Гр и времени наблюдения до 280 ч.

Способность корня продолжать рост после облучения объясняется спецификой клеточных популяций меристемы. При облучении в определенных пределах, не превышающих летального уровня, происходит подавление деления основной части меристемы, с последующим выходом поврежденных клеток за ее пределы, а именно в

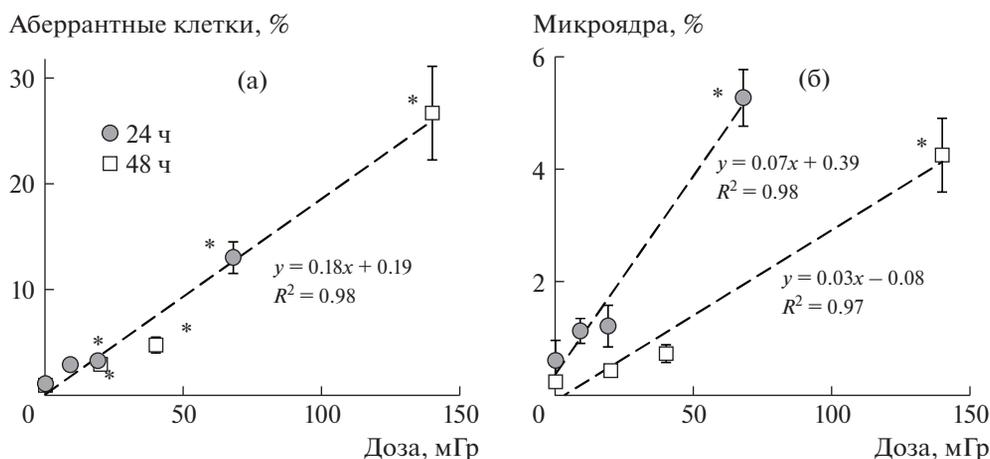


Рис. 2. Зависимость частоты нарушений на стадии ана-телофазы (а) и частоты микроядер (б) в клетках от величины поглощенной дозы при разной длительности γ -облучения.

* Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).

Fig. 2. Absorbed dose dependence of the frequencies aberrations in ana-telophase stage (a) and micronuclei (b) in the cells for different duration of γ -irradiation.

* Statistically significant difference from the control level ($p < 0.05$).

зону растяжения. В то же время клетки покоящегося центра начинают активно делиться, восстанавливая тем самым основную часть меристемы. Устойчивость клеток покоящегося центра к действию радиации вызвана их пониженной метаболической активностью, а также протяженностью клеточного цикла (более длительный период G_1) [23, 25].

Облучение приводит к снижению роста корня только спустя некоторое время после начала воздействия, что нами и наблюдалось ранее [13]. Замедление роста в таком случае объясняется снижением скорости перехода клеток к растяжению, которое в свою очередь обусловлено подавлением делений. Интенсивность деления клеток очень чувствительна к различным факторам. Поэтому при снижении скорости делений под действием ионизирующего излучения стоит ожидать снижения скорости выхода клеток из меристемы, хотя само воздействие на переход клеток к растяжению не влияет [23].

Одним из важных эффектов действия радиации на живые клетки является препятствие нормальной митотической активности. Замедление деления клеток отражается на величине митотического индекса, и, как правило, снижение значения этого показателя связано с остановкой клеток на какой-либо стадии митоза. Наш эксперимент показал, что в целом величина митотического индекса остается постоянной во времени и не зависит от дозы ионизирующего излучения. Однако выявленный нами факт накопления клеток на стадии профазы в меристеме проростков, получивших дозу 140 мГр, косвенно свидетельствует о начале задержки клеточного цикла. При этом используемой в эксперименте мощности дозы недостаточно для того, чтобы эффект отразился на величине митотического индекса в целом. Так, например, в работе S.G. Vaijарикаг и соавт. [24] было отмечено снижение митотической активности корневой меристемы головок лука при 20000 мГр. В работе R. Zaka и соавт. [3] при облучении 6-дневных проростков гороха показано уменьшение митотического индекса при дозе 400 мГр.

Ранее считалось, что задержка делений обуславливается главным образом задержкой профазы: действие облучения приводит к нарушению синтеза ДНК и процессов редупликации и, как следствие, затруднению конденсации хромосом в профазе; завершение профазы, в свою очередь, свидетельствует о завершении процесса восстановления [18, 26]. В какой-то степени данное утверждение остается верным, однако в настоящее время изменения в динамике деления клеток связывают с действием регуляторов прохождения клеточного цикла, осуществляющимся во время перехода между фазами. Решающими моментами в регуляции клеточного цикла являются переходы между пресинтетической и синтетической фазами (G_1/S) и постсинтетической фазой и нача-

лом митоза (G_2/M). Связано это с наличием особых контрольных точек. В G_1/S -переходе это точка рестрикции, в которой клетка “принимает решение” о подготовке к следующему циклу (запуск репликации) или о выходе из него. В фазе G_2/M – контрольная точка, которая останавливает клетки на этой фазе, при обнаружении повреждений в ДНК [27]. С данной точки зрения, задержку клеток в профазе в наших экспериментах (табл. 1) можно рассматривать как следствие prolongации времени для репарации радиационно-индуцированных разрывов ДНК [28]. В связи с этим имеет значение то, на какой стадии клетка подверглась радиационному воздействию. Клетки, находящиеся в начале стадии G_1 , наименее чувствительны к действию радиации. При этом если клетка облучилась, находясь на стадии поздней профазы или после нее, – процесс деления не прерывается. При облучении клеток, пребывающих на стадиях G_2 и S (до стадии ранней профазы), возможна остановка митоза или его временная задержка с последующим восстановлением, в зависимости от полученной дозы [24].

Среди всех оцениваемых параметров воздействия радиации на организм наиболее простым и эффективным показателем цитологических повреждений является уровень микроядер. Кроме того, считается, что количество радиационно-индуцированных микроядер сильно коррелирует с дозой [29].

В данной работе (табл. 2, рис. 2, б) нами показано достоверное увеличение доли клеток с микроядрами в проростках семян, расположенных ближе всего к источнику излучения (максимальные дозы облучения) при величинах поглощенных доз 70 и 140 мГр (24 и 48 ч воздействия). В нашей ранней работе с проростками семян лука повышение уровня микроядер отмечалось, начиная с дозы 1000 мГр при 24 ч облучения [14]. Однако в работе S.G. Vaijарикаг и соавт. [24] увеличение доли микроядерных клеток облученных корней головок лука происходит при более высокой дозе 4000 мГр. Также нами было выявлено снижение уровня микроядер с течением времени наблюдения. В работе [24] тоже показано снижение количества микроядер по мере наблюдения длительностью до 120 ч, но в качестве стартовой точки было выбрано время экспозиции 48 ч. Обнаруженное явление может быть объяснено исходя из нижеследующего. В зависимости от причины возникновения и механизма образования микроядра возможны различные варианты дальнейшего развития событий в клетке. Хромосомные микроядра (образованные из “отставшей” хромосомы) достаточно часто имеют интактную ядерную оболочку, оставаясь за счет этого функционально активными, т.е. способными осуществлять процессы транскрипции и трансляции. В том случае, если в течение интерфазы произойдет репарация повреждений кинетохорного района, во время

следующего митоза хромосома может встроиться в веретено деления и войти в состав ядра одной из дочерних клеток. Также не исключается вариант, в котором хромосома, не имеющая нормального кинетохора, может примкнуть к одной из хромосомных групп в анафазе и войти в состав ядра. Микроядра, образовавшиеся из интерфазного хроматина (ядерный блеббинг), ацентрических фрагментов или в результате разрушения хромосомного моста, в большинстве случаев деградируют. Если же элиминация микроядра невозможна, а урон, нанесенный клетке его присутствием, не совместим с жизнью, происходит ее гибель [30, 31].

Очень небольшое количество меристематических клеток делится поперечно, т.е. в радиальном направлении для увеличения обхвата корня, в то время как большинство клеток делится в продольном направлении. Часть клеток, пройдя полный клеточный цикл, переходит в следующую за меристемой зону корня, формируя клеточную популяцию F1 [32]. В связи с этим ранее была предложена модификация микроядерного анализа, предполагающая подсчет клеток с микроядрами, располагающимися именно в этой части корня (F1) [32]. В свою очередь D.M. Leme и M.A. Morales [8] считают анализ хромосомных aberrаций вкуче с учетом микроядер в меристематических клетках равноценным анализу микроядер в клетках первого поколения.

Таким образом, выявленное нами снижение уровня микроядер при 48-часовом облучении по сравнению с 24-часовым можно объяснить, во-первых, выходом микроядерных клеток за пределы зоны обнаружения (при используемом нами методе учета микроядер), во-вторых, клеточными процессами, направленными на уничтожение микроядер, и, в-третьих, работой систем репарации.

Клеточный цикл корневой меристемы лука занимает порядка 23 ч, из которых 4 ч приходятся на митоз [17]. К концу 48-часовой экспозиции большинство клеток должны пройти как минимум два клеточных цикла и перейти к третьему. Вполне возможно, что за указанный промежуток времени в клетках корней экспериментальных образцов могли протекать все вышеперечисленные явления.

К основным типам цитологических изменений, наблюдаемым при облучении клеток меристемы, наряду с задержкой митотического цикла, потерей способности к пролиферации и гибели клеток, относится образование хромосомных aberrаций, приводящих к появлению патологических митозов [33].

По результатам эксперимента было выявлено достоверное увеличение числа ана-телофазных клеток с хромосомными aberrациями, начиная с поглощенной дозы 20 мГр (табл. 3, рис. 2, а). При этом количество аномальных клеток возрастало при увеличении поглощенной дозы и времени воздействия. В нашей предыдущей работе при об-

лучении проростков семян лука длительностью 24 ч возрастание числа aberrантных клеток происходило при дозе 50 мГр [14].

Клетка считается наиболее чувствительной к воздействию в пресинтетический и синтетический периоды [17, 18]. Поэтому аномалии митоза, наблюдаемые в эксперименте после 24-часового облучения, возникли в течение первых 16 ч в клетках, находящихся на тот момент в соответствующей стадии. В клетках, находящихся на момент облучения на стадии митоза, также могут возникать нарушения, однако зафиксировать их можно только в следующем клеточном цикле [18].

Ранее отмечалось, что наибольший вклад в долю аномальных митозов при облучении вносил такой тип нарушений, как фрагменты, который достоверно отличался от контроля почти на всех уровнях облучения (табл. 3). Это логично, так как данный тип аномалии представляется наиболее вероятным в силу простоты механизма его образования. Также следует отметить существенный вклад нарушений типа “множественные”, который составил 25% от общего числа аномалий при самой высокой поглощенной дозе (140 мГр). Данное явление свидетельствует в пользу того, что при увеличении дозы происходит накопление хромосомных aberrаций в пределах одной клетки, а эффективность репарации при этом снижается.

Довольно трудно однозначно сказать, являются ли выявленные отличия цитогенетических параметров (частоты хромосомных aberrаций и микроядер) от контроля следствием интенсивности или длительности радиационного воздействия. Схема проведенного эксперимента предполагает скоррелированность временной и дозовой переменных: величина поглощенной дозы определялась временем облучения и расстоянием проростков семян от источника излучения (мощность дозы). Как уже отмечалось, на рис. 2 представлены дозовые зависимости клеток с частотой аномальных митозов и микроядер. Дозовая зависимость частоты хромосомных нарушений (рис. 2, а) описывается одним линейным уравнением ($y = 0.18x + 0.19$, $R^2 = 0.98$) при длительности облучения как 24, так и 48 ч. Однако дозовые зависимости частоты микроядер (рис. 2, б) хотя и имеют линейный характер, но различаются при разных длительностях облучения (24 и 48 ч). Это свидетельствует о том, что для образования хромосомных нарушений основным фактором является доза облучения, в то время как для выхода микроядер длительность воздействия также становится главным фактором наряду с дозовым эффектом.

Результаты эксперимента по облучению проростков семян лука показали, что наиболее чувствительным цитогенетическим параметром является частота встречаемости aberrантных клеток. Достоверные отличия от контроля зарегистрированы на уровне 20 мГр для 24 и 48 ч облучения со-

ответственно. Микроядерный индекс показал достоверные различия только для самых больших уровней доз, используемых в эксперименте (70 и 140 мГр). При этом дозовая зависимость частоты клеток с микроядрами и хромосомными нарушениями имела линейный характер. Угнетение роста корней наблюдалось при облучении проростков в течение 2 сут при дозе 140 мГр. Подавления митотической активности обнаружено не было, однако, при дозе 140 мГр (48 ч облучения) отмечено накопление клеток на стадии профазы, что указывает на начало задержки клеточного цикла. Таким образом, на основании проведенных исследований можно ранжировать параметры био-теста в отношении малых доз γ -излучения по мере убывания чувствительности:

частота aberrантных клеток >

> частота микроядер >

> митотический индекс = длина корней.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке местного гранта РФФИ и Красноярского краевого фонда науки № 18-44-240001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. UNSCEAR 2006. Effects of Ionizing Radiation. United Nations. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Volume II: Annex C. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation. New York: United Nations, 2009. P. 1–79.
2. Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Aptikaeva G.F. et al. Low doses of gamma-radiation induce nonlinear dose responses in mammalian and plant cells // *Nonlinear. Biol. Toxicol. Med.* 2004. V. 2. № 3. P. 213–221. <https://doi.org/10.1080/15401420490519861>
3. Zaka R., Chenal C., Misset M.T. Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem // *Mutat. Res. / Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2002. V. 517. № 1–2. P. 87–99. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00056-6)
4. UNSCEAR 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Volume II: Effects. Annex G. Biological effects at low radiation doses. New York: United Nations, 2000. P. 75–161.
5. Ильин Л.А., Рождественский Л.М., Котеров А.Н., Борисов Н.М. Актуальная радиобиология. М.: Изд. дом МЭИ, 2015. 240 с. [Ильин Л.А., Рождественский Л.М., Котеров А.Н., Борисов Н.М. Aktual'naja radiobiologija. M.: Izdatel'skij dom MJEI, 2015. 240 p. (in Russian)]
6. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Kim J.K. et al. Cytogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose–effect relationship // *Radiat. Environ. Biophys.* 2007. № 46. 31–41. <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0094-3>
7. George J.T., Patel B.B., Rane V.A. et al. Non-linear dose response of a few plant taxa to acute gamma radiation // *Cytologia.* 2014. V. 79. № 1. P. 103–109. <https://doi.org/10.1508/cytologia.79.103>
8. Leme D.M., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Mutat. Res. / Rev. Mutat. Res.* 2009. V. 682. № 1. P. 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
9. Bonciu E., Firbas P., Fontanetti C.S. et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay // *Caryologia.* 2018. V. 71. № 3. P. 191–209. <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1503496>
10. Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident // *Mutat. Res. / Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 1998. № 415. P. 47–57. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00053-9)
11. Tkalec M., Malari K., Pavlica M. et al. Effects of radio-frequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. // *Mutat. Res. / Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2009. № 672. P. 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.022>
12. Синовец С.Ю., Пяткова С.В., Козьмин Г.В. Экспериментальное обоснование использования Аллиум-теста в радиоэкологическом мониторинге // *Изв. ВУЗов. Ядерная энергетика.* 2009. № 1. С. 32–38. [Sinovec S.Ju., Pjatkova S.V., Koz'min G.V. Jeksperimental'noe obosnovanie ispol'zovanija Allium-testa v radiojekoologicheskom monitoringe // *Izv. VUZov. Jadernaja jenergetika.* 2009. № 1. P. 32–38. (in Russian)]
13. Трофимова Е.А., Дементьев Д.В., Болсуновский А.Я. Влияние γ -излучения на развитие растений из облученных семян и проростков *Allium cepa* L. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2019. Т. 59. № 3. С. 293–299. [Trofimova E.A., Dementyev D.V., Bolsunovskiy A.Ya. The Effect of γ -Rays on the Development of Plants from Irradiated Seeds and Seedlings of *Allium cepa* L. // *Radiation biology. Radioecology.* 2019. V. 59. №3. P. 293–299. (in Russian)]
14. Bolsunovskiy A.Y., Dementyev D.V., Trofimova E.A. et al. Chromosomal aberrations and micronuclei induced in onion (*Allium cepa*) by gamma-radiation // *J. Environ. Radioact.* 2019. № 207. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.05.014>
15. Esnault M.A., Legue F., Chenal C. Ionizing radiation: advances in plant response // *Environ. Experim. Botany.* 2010. V. 68. № 3. 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.01.007>
16. Geras'kin S., Churyukin R., Volkova P. Radiation exposure of barley seeds can modify the early stages of plants' development // *J. Environ. Radioact.* 2017. № 177. P. 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.06.008>
17. Matagne R. Chromosomal aberrations induced by dialkylating agents in *Allium cepa* root-tips and their relation to the mitotic cycle and DNA synthesis // *Radiat. Botany.* 1968. V. 8. № 6. 489–497. [https://doi.org/10.1016/S0033-7560\(68\)80111-5](https://doi.org/10.1016/S0033-7560(68)80111-5)
18. Лу Д.Е. Действие радиации на живые клетки. М.: Госатомиздат, 1963. 288 с. [Lea D.E. Actions of radi-

- ations on living cells. M.: Gosatomizdat; 1963. 288 p. (in Russian)]
19. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Межгосударственный стандарт. Стандарты на методы контроля. М., 2002. 28 с. [GOST 12038-84. Semena sel'skhozjajstvennyh kul'tur. Metody opredelenija vshozhesti. Mezghosudarstvennyj standart. Standarty na metody kontrolja. M., 2002. 28 p. (in Russian)]
 20. *Bolsunovskiy A., Melgunov M.* Radioactive particles in the Yenisei River floodplain (Russia): characterization, leaching and potential effects in the environment // *J. Environ. Radioact.* 2019. V. 208–209. № 105991. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.105991>
 21. *Rasband W.S.* Image J. U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA, 1997–2019. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Accessed February 7, 2020.
 22. *Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol. Electronica.* 2001. V. 4. № 1. 9 p.
 23. *Иванов В.Б.* Меристема как самоорганизующаяся система: поддержание и ограничение пролиферации клеток // *Физиол. растений.* 2004. Т. 51. № 6. С. 926–941. [*Ivanov V.B.* Meristem as a self-renewing system: maintenance and cessation of cell proliferation (a review) / *Russian Journal of Plant Physiology.* 2004. V. 51. № 6. P. 834–847. (in Russian)]
 24. *Vaijapurkar S.G., Agarwal D., Chaudhuri S.K. et al.* Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose // *Radiat. Measur.* 2001. V. 33. № 5. P. 833–836. [https://doi.org/10.1016/S1350-4487\(01\)00246-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4487(01)00246-3)
 25. *Clowes F.A.L.* The duration of the G1 phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity // *New Phytologist.* 1965. V. 64. № 3. P. 355–359. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1965.tb07544.x>
 26. *Алов И.А.* Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 263 с. [*Alov I.A.* Citofiziologija i patologija mitoza. M.: Medicina, 1972. 263 p. (in Russian)]
 27. *Rossi V., Varotto S.* Insights into the G1/S transition in plants // *Planta.* 2002. V. 215. № 3. P. 345–356. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0780-y>
 28. *Лебедева Л.И., Федорова С.А., Трунова С.А. и др.* Митоз. Регуляция и организация деления клеточного ядра // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 12. С. 1589–1608. [*Lebedeva L.I., Fedorova S.A., Trunova S.A. et al.* Mitosis: regulation and organization of cell division // *Russian Journal of Genetics.* 2004. V. 40. № 12. P. 1313–1330. (in Russian)].
 29. *Vral A., Fenech M., Thierens H.* The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure // *Mutagen.* 2011. V. 26. № 1. P. 11–17. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>
 30. *Кисурина-Евгеньева О.П., Сутягина О.И., Онищенко Г.Е.* Биогенез микроядер (обзор) // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 5. С. 612–624. [*Kisurina-Evgenieva O.P., Sutiagina O.I., Onishchenko G.E.* Biogenesis of micronuclei // *Biochemistry (Moscow).* 2016. V. 81. № 5. P. 453–464. (in Russian)]
 31. *Luzhna L., Kathiria P., Kovalchuk O.* Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond // *Front. Genet.* 2013. V. 4. P. 131. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
 32. *Ma T.H., Xu Z., Xu C. et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants // *Mutat. Res. / Environ. Mutagen. Relat. Subjects.* 1995. V. 334. № 2. P. 185–195. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)
 33. *Evans H.J.* Chromosome aberrations induced by ionizing radiations // *Int. Rev. Cytol. Acad. Press.* 1962. № 13. P. 221–321. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60285-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60285-5)

The Effect of Low-Dose γ -Radiation on Cytogenetic Endpoints of Onion (*Allium cepa*) Seedlings in Experiments of Various Durations

A. V. Zueva^{a, #}, E. A. Trofimova^a, D. V. Demytyev^a, and A. Ya. Bolsunovskiy^a

^a Institute of Biophysic, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, Russia

[#]E-mail: an.v.zueva@ya.ru

The present study addresses response of onion (*Allium cepa* L.) seedlings to low-dose γ -radiation exposure (10 to 140 mGy) of various durations (24 and 48 h) based on growth and cytogenetic endpoints. The most sensitive endpoints to γ -radiation are the frequencies of occurrence of abnormal cells and micronuclei, which significantly differ from the control at the lowest doses of 20 and 70 mGy, respectively. The number of cells with micronuclei and chromosomal aberrations increases linearly with an increase in the absorbed dose, but the frequency of occurrence of micronuclei differs depending on the duration of exposure as well. The main factor for chromosomal aberrations to occur is exposure dose, while for the yield of micronuclei, the duration of exposure is also an important factor. Bioassay endpoints have been ranked by their response to low-dose γ -radiation.

Keywords: Allium test, onion seeds, seedlings, roots, γ -radiation, mitotic abnormalities, chromosome aberration, mitotic index, micronuclei, dose dependencies, low doses

УДК 539.163:574.63:591.111.1:597

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ КРОВИ РЫБ, ОБИТАЮЩИХ В ВОДОЕМАХ НА ТЕРРИТОРИИ ПОЛЕССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

© 2021 г. А. В. Гулаков^{1,*}, Д. Н. Дроздов¹, Д. Н. Иванцов²

¹ Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины, Гомель, Беларусь

² Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Хойники, Беларусь

*E-mail: Gulakov.andr@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.05.2019 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

В статье представлены результаты морфометрического анализа эритроцитов крови разных видов рыб, обитающих в водоемах на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника. В работе показано, что у рыб разных видов различаются продольные и поперечные размеры эритроцитов. Размеры клеток характеризуются низкой вариацией, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) смещено в сторону ядра, что может косвенно свидетельствовать о наличии клеточной адаптации. Микроядерный тест показал достоверное различие частоты встречаемости микроядер у рыб разных видов, отличающихся способом получения пищи и содержанием ¹³⁷Cs в мышечной ткани. Анализ препаратов крови рыб показал, что содержание микроядер в эритроцитах рыб разных видов распределилось следующим образом: обыкновенная щука – $3.14 \pm 0.24\%$, серебряный карась – $2.08 \pm 0.36\%$, речной окунь – $1.84 \pm 0.39\%$, линь – $1.26 \pm 0.28\%$, обыкновенная плотва – $1.13 \pm 0.34\%$. Частота микроядер превышала верхнюю границу спонтанного уровня, достоверные различия установлены для трех видов: обыкновенная щука, серебряный карась и речной окунь ($p < 0.05$). Корреляционный анализ данных удельной активности, ЯЦО и частоты микроядер показал отсутствие статистически значимой корреляционной связи, $r = 0.43$ ($p > 0.05$) и $r = 0.67$ ($p > 0.05$). Однако прослеживается тенденция, показывающая, что с увеличением удельной активности ¹³⁷Cs в мышечной ткани, в эритроцитах рыб разных видов увеличивается частота микроядер: на 1000 Бк/кг удельной активности число клеток с микроядрами увеличивается на пять единиц.

Ключевые слова: ихтиофауна, радиоактивное загрязнение, мышечная ткань, удельная активность ¹³⁷Cs, эритроциты, ЯЦО, микроядерный тест

DOI: 10.31857/S0869803121020090

Мониторинг антропогенного влияния на биоту является необходимой мерой, которая позволяет давать текущую оценку и прогнозировать возможные события, связанные с изменением экологической ситуации. Такого рода контроль важен для территорий радиоактивного загрязнения или территорий с повышенной техногенной нагрузкой со стороны предприятий ядерно-топливного цикла, химических или иных объектов [1, 2].

Фактор радиоактивного загрязнения территорий Республики Беларусь и по сегодняшний день сохраняет свое значение, в особенности для юго-восточных областей. Действие техногенного радиационного фактора сочетается с действием естественных радионуклидов, а также других антропогенных поллютантов [3–5].

Современным приоритетом в условиях меняющейся парадигмы радиационной безопасности является не только человек, но и объекты биологической среды, прежде всего естественных экологических систем, которые подвергаются воздействию со стороны не только радиационного фактора на территориях радиоактивного загрязнения, но и сочетанного воздействия всех возможных факторов антропогенного характера.

Оценка сочетанного действия на биоту представляет важную научную и практическую задачу, которую можно решить в условиях существующего в нашей стране Полесского государственного радиационно-экологического заповедника. Важной научной задачей является определение видов-индикаторов состояния биоты, выбор кото-

рых должен быть тщательно обоснован и требует строгого методологического подхода, позволяющего давать оценку не только на данный момент, но и прогнозировать вероятное развитие событий в экосистемах в перспективе.

В настоящее время накоплен большой опыт изучения влияния радиационного фактора на систему кровообращения разных видов позвоночных животных [6–9]. Ионизирующее излучение может вызывать цитотоксические и цитогенетические эффекты, которые сопровождаются изменениями, в том числе и на уровне морфологии клетки. В результате в системе кровообращения возникают формы клеток крови с цитоморфологическими изменениями, которые могут служить в качестве биологических маркеров [10].

Интерес для изучения радиационных эффектов представляет гидросфера, где происходит не только накопление, но и быстрая (по сравнению с почвой) трансформация источников загрязнения в пищевых цепях. Наиболее чувствительными к действию радиационного фактора являются планктонные организмы и ихтиофауна, занимающая верхний трофический уровень в пресноводных экосистемах. Представители пресноводной ихтиофауны различаются аккумулятивной способностью в отношении радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr . В работе белорусских исследователей показано, что максимальные значения удельной активности ^{137}Cs и ^{90}Sr в рыбе наблюдаются в непроточных водоемах, расположенных на территориях с высоким уровнем радиоактивного загрязнения, а минимальные значения – в проточных речных системах [11].

На территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника находятся непроточные водоемы, которые отличаются высоким уровнем радиационного загрязнения ^{137}Cs и ^{90}Sr . Представители аборигенной ихтиофауны данных водоемов в силу характера питания имеют существенные различия удельной активности ^{137}Cs в мышечной и ^{90}Sr в костной ткани. Среди представителей ихтиофауны выделяются три группы: пелагические “мирные рыбы” (линь, плотва, густера, лещ, синец), пелагические “хищные рыбы” (щука, окунь) и хищные бентофаги (карась), отличающиеся способностью аккумулировать радионуклиды. В этой связи представляется возможным оценить показатели, отражающие цитотоксическое и цитогенетическое действие радионуклидов на кровеносение рыб, в зависимости от уровня радиоактивного загрязнения водоема, а также какой вид рыбы в большей степени подходит на роль вида-индикатора.

Цель исследований – анализ цитогенетических и цитотоксических эффектов в эритроцитах крови рыб, обитающих в водоемах с разным уровнем радиоактивного загрязнения, расположен-

ных на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили данные радиоспектрометрического анализа и препараты крови рыб пяти видов: обыкновенная плотва (*Rutilus rutilus* L., 1758), речной окунь (*Perca fluviatilis* L., 1758), линь (*Tinca tinca* L., 1758), серебряный карась (*Carassius auratus gibelio* Bloch., 1782) и обыкновенная щука (*Esox lucius* L., 1758). Перечисленные виды являются аборигенными представителями ихтиофауны Белорусского Полесья и составляют основную массу (от 70 до 90%) небольших эвтрофных озер [12, 13].

Отлов рыб производили в летний и осенний период 2018 г. Всего за время проведения исследований было отловлено 138 экземпляров пресноводной ихтиофауны. Сбор материала осуществляли на семи участках: четырех замкнутых непроточных водных объектов – озера Выюры, Жартай, Лядо, Персток и трех проточных водных объектов – русло р. Несвич, Николаевский старик и Старое русло р. Припять.

В качестве орудий лова были использованы сети трехстенные “Нептун” длина 30 м, высота 1.8 м, размер ячеи 30 мм (2 шт.), 40 мм (2 шт.), 50 мм (2 шт.), 65 мм (2 шт.), 70 мм (2 шт.). При проведении лова рыб одновременно устанавливалось от двух до восьми сетей с разным размером ячеи [14]. Определение видов и анализ биологических показателей рыб проводили общепринятыми в ихтиологических исследованиях методами [15–17].

Измерение удельной активности образцов проводили в лаборатории спектрометрии и радиохимии Полесского государственного радиационно-экологического заповедника с использованием γ - β -спектрометра МКС-АТ1315.

Гематологический анализ препаратов крови осуществляли в лаборатории кафедры зоологии, физиологии и генетики Учреждения образования “Гомельский государственный университет им. Франциска” Скорины по методике МУ № 13-4-2/1487 от 1999 г. [18].

Кровь собирали в пробирки Eppendorf Tubes 5.0 мл, обработанные раствором трилона Б (Eppendorf AG, Hamburg, Германия). Для каждой особи готовили не менее двух препаратов, согласно методикам, изложенным в работах Б. Ромейс, Г.И. Роскина и Л.Б. Левинсон [19, 20].

Препараты высушивали на воздухе, фиксировали и окрашивали по Романовскому. Для анализа использовались эритроциты – клетки с плотным, вытянутым по длине сине-фиолетовым ядром и широким слоем оранжево-розовой цитоплазмы.

Микроскопию препаратов проводили с помощью светового микроскопа OPTITECH XSZ-139

(Ningbo Instrument Co., Ltd China, Китай), при увеличении 10×100 , микролинейкой определяли продольный и поперечный размеры, оценивали форму, подсчитывали количество микроядер в цитоплазме на 1000 клеток. Данные анализа сравнивали с литературными источниками [21, 22].

При анализе количественных показателей исходили из средних значений клеток — для продольного размера 10.0–20.0 мкм, для поперечного размера 5.5–11.5 мкм; ядер — для продольного размера 3.0–8.0 мкм, для поперечного размера 2.0–3.5 мкм.

На основании полученных данных общепринятыми методами вариационной статистики определяли характеристики распределения. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента для уровня статистической значимости $p \leq 0.05$. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ препаратов крови рыб разных видов показал, что эритроциты имеют вытянутую в продольном направлении овальную форму. Ядро ближе к сферической форме, вытянуто в продольном направлении. С помощью канонического уравнения для эллипса и данных микрометрии с соблюдением клеточных пропорций нами были построены усредненные модели эритроцитов рыб разных видов, которые представлены на рис. 1.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что наибольшие морфометрические размеры имели эритроциты серебряного карася, наименьшие — эритроциты обыкновенной щуки и речного окуня. У линя, обыкновенной щуки и речного окуня ядра имеют сферическую форму, а у обыкновенной плотвы и серебряного карася овальную.

В табл. 1 представлено распределение ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) эритроцитов у рыб разных видов в зависимости от места отлова. Из данных, приведенных в табл. 1 видно, что максимальные значения ЯЦО эритроцитов наблюдались у щуки обыкновенной, отловленной в непроточных водоемах — оз. Лядо (0.279), оз. Жартай (0.239) и оз. Вьюры (0.233).

В работах [21, 22] представлены морфометрические параметры и оценка экологической пластичности эритроцитов пресноводных рыб. Согласно данным авторов, средние значения ЯЦО эритроцитов рыб рассматриваемых нами видов распределяются следующим образом: щука — 0.154 ± 0.016 , карась — 0.102 ± 0.009 , линь — 0.139 ± 0.018 , окунь — 0.107 ± 0.015 , плотва — 0.113 ± 0.025 .

Средние взвешенные значения ЯЦО эритроцитов рыб, полученные в ходе исследования, рас-

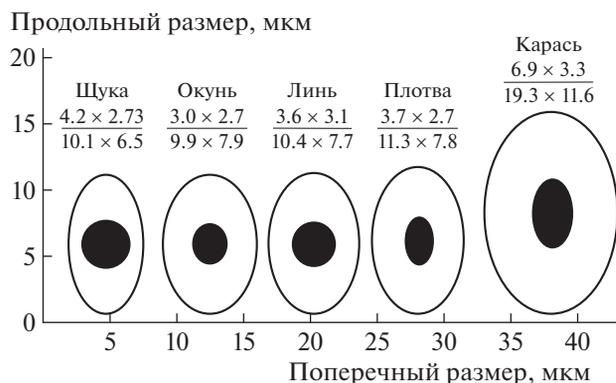


Рис. 1. Пропорции эритроцитов рыб разных видов.

Fig. 1. Proportions of erythrocytes of fish of different species.

пределились следующим образом: щука — 0.201 ± 0.023 , карась — 0.131 ± 0.005 , линь — 0.124 ± 0.003 , окунь — 0.116 ± 0.002 , плотва — 0.113 ± 0.009 . Сравнительный анализ показал достоверные различия между средними значениями ЯЦО эритроцитов щуки (в 1.5 раза) и карася (в 1.3 раза) с данными литературных источников. Значения ЯЦО эритроцитов остальных видов не превышали верхних границ обозначенных выше диапазонов и не имели достоверных различий ($p > 0.05$).

Анализ данных табл. 1 показал, что распределение средних значений ЯЦО эритроцитов рыб разных видов не зависит от удельной активности ^{137}Cs в воде, корреляция слабая или отсутствует ($r < 0.4$). Не установлено достоверного различия ЯЦО эритроцитов у “мирных” пелагических видов и окуня ($p > 0.05$), отловленных в водоемах, расположенных на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника. В то же время для пелагического хищника щуки и хищного бентофага карася имеет место достоверное различие средних значений ЯЦО в проточных и непроточных водных объектах ($p < 0.05$). У особей щуки, отловленных в непроточных водных объектах, ЯЦО эритроцитов составляет 0.239 ± 0.019 , в проточных объектах — 0.170 ± 0.024 ; у особей карася, отловленных в непроточных водных объектах, ЯЦО эритроцитов 0.120 ± 0.015 , в проточных объектах — 0.050 ± 0.005 .

В табл. 2 представлены значения числа микроядер (МЯ), обнаруженные в эритроцитах рыб разных видов в зависимости от места отлова.

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что максимальное количество МЯ наблюдается в эритроцитах щуки, отловленной в оз. Вьюры — 4.26%. Минимальное количество МЯ наблюдается в эритроцитах плотвы, отловленной в реке Припять — 0.5%. Между числом МЯ в эритроцитах линя и окуня и удельной активностью воды установлена достоверная корреляция ($r = 0.98$ и

Таблица 1. Значения ЯЦО эритроцитов у рыб разных видов, отловленных на водных объектах с разным уровнем радиоактивного загрязнения
Table 1. NCR values of erythrocytes in fish of different species caught in water bodies with different levels of radioactive contamination

Водный объект	Вид рыбы				
	карась	линь	окунь	плотва	щука
Старое русло р. Припять, 0.64 Бк/л*	—	0.16 (<i>n</i> = 5) **	0.11 (<i>n</i> = 12)	0.12 (<i>n</i> = 15)	0.20 (<i>n</i> = 6)
р. Несвич, 6.60 Бк/л	0.10 (<i>n</i> = 3)	0.14 (<i>n</i> = 3)	—	—	0.12 (<i>n</i> = 3)
Николаевский старик, 1.14 Бк/л	0.10 (<i>n</i> = 3)	0.15 (<i>n</i> = 3)	—	—	0.16 (<i>n</i> = 3)
оз. Персток, 8.60 Бк/л	0.12 (<i>n</i> = 11)	0.16 (<i>n</i> = 3)	0.12 (<i>n</i> = 5)	0.10 (<i>n</i> = 6)	0.21 (<i>n</i> = 2)
оз. Жартай, 2.25 Бк/л	—	—	0.12 (<i>n</i> = 10)	0.15 (<i>n</i> = 14)	0.24 (<i>n</i> = 3)
оз. Лядо —	0.12 (<i>n</i> = 7)	—	—	—	0.28 (<i>n</i> = 2)
оз. Вьюры, 1.13 Бк/л	—	—	0.12 (<i>n</i> = 7)	0.08 (<i>n</i> = 8)	0.23 (<i>n</i> = 3)

* Удельная активность ^{137}Cs в воде; ** в скобках указано количество особей.

$r = 0.78$, $p < 0.05$), для остальных рыб корреляция слабая или отсутствует ($r < 0.4$). Анализ данных табл. 2, проведенный с учетом пищевого поведения рыб, показал, что у “мирных” пелагических видов число МЯ составляет в среднем 1.20‰, у хищного бентофага карася 2.08‰, у пелагических хищников щуки и окуня — 2.50‰.

В современной научной литературе приводится достаточно широкий диапазон частоты образования МЯ в эритроцитах пресноводных рыб, согласно ([23], с. 253) среднегодовая спонтанная частота образования МЯ в эритроцитах рыб разных видов оценивается от 0.5 до 1.0‰. Данный показатель может сильно варьировать и зависит от сезона, насыщения кислородом воды и других факторов. В ряде исследований (Кузина, 2009) показано, что число МЯ может значительно изменяться в весенне-летний (до 0.20‰) и осенне-зимний (0.5–0.10‰) периоды [24]. Поскольку отлов рыб проводился в конце лета и преимущественно в сентябре — октябре 2018 г., мы исходили из того, что спонтанная частота образования МЯ составляет 0.5–1.0‰. В результате исследований установлено, что среднее взвешенное число МЯ в эритроцитах рыб разных видов распределяется следующим образом: щука — $3.14 \pm 0.24\%$, карась — $2.08 \pm 0.36\%$, окунь — $1.84 \pm 0.39\%$, линь — $1.26 \pm 0.28\%$, плотва — $1.13 \pm 0.34\%$. Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что у пелагических и бентосных хищных рыб, обитающих на территории Полесского госу-

дарственного радиационно-экологического заповедника, частота образования МЯ достоверно выше спонтанного уровня.

В табл. 3 представлены данные средней удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани рыб разных видов в зависимости от места отлова.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, имеет место высокая вариация показателей удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани особей разных видов рыб, вне зависимости от места отлова как в непроточных, так и в проточных водоемах. Максимальные значения средней удельной активности ^{137}Cs наблюдаются у карася и щуки. Значения средней удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани распределились следующим образом: карась — 2684 ± 428 Бк/кг, щука — 2410 ± 489 Бк/кг, линь — 1304 ± 255 Бк/кг, плотва — 307 ± 76 Бк/кг, окунь — 272 ± 69 Бк/кг. Высокий уровень радиоактивного загрязнения мышечной ткани ^{137}Cs карася и щуки объясняется тем, что карась является бентофагом с высокими темпами роста (до 70 г/мес.), а обыкновенная щука — это активный пелагический хищник, занимающий верхний трофического уровня в водной экосистеме.

Вместе с тем из данных табл. 3 видно, что удельная активность мышечной ткани ^{137}Cs таких видов, как линь, плотва, карась и щука, отловленных в проточных водоемах (Николаевский старик и Старое русло р. Припять), не превышает 150 Бк/кг. Исключение составила выборка плотвы. Среди осо-

Таблица 2. Частота МЯ в эритроцитах у рыб разных видов, отловленных на водных объектах с разным уровнем радиоактивного загрязнения (%)

Table 2. Frequency of MN in erythrocytes of fish of different species caught in water bodies with different levels of radioactive contamination (%)

Водный объект	Вид рыбы				
	карась	лινь	окунь	плотва	щука
Старое русло р. Припять, 0.64 Бк/л	—	1.00	1.34	0.50	1.76
р. Несвич, 6.60 Бк/л	2.31	1.32	2.00	—	2.84
Николаевский старик, 1.14 Бк/л	1.33	0.92	1.61	—	2.67
оз. Персток, 8.60 Бк/л	1.55	1.80	2.24	1.23	3.64
оз. Жартай, 2.25 Бк/л	—	—	—	1.29	3.48
оз. Лядо	3.14	—	—	—	3.34
—	—	—	—	—	—
оз. Вьюры, 1.13 Бк/л	—	—	2.00	1.52	4.26

бей, отловленных на объекте Николаевский старик, удельная активность ^{137}Cs более чем в 1.5 раза превышает допустимый уровень. Высокая удельная активность мышечной ткани рыб разных видов наблюдается на проточном объекте р. Несвич, где

отмечается высокое содержание ^{137}Cs в воде (6.60 Бк/л) и донных отложениях 3220 Бк/кг [25].

Методом корреляционного анализа с использованием параметрического коэффициента Пирсона проведена оценка связи между удельной активностью ^{137}Cs в мышечной ткани, величиной ЯЦО и частотой МЯ в эритроцитах рыб. Анализ статистической мощности данных удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани, ЯЦО и МЯ в эритроцитах рыб, распределенных на группы по видам и водоемам, показал отрицательный результат, поскольку статистическая мощность составила менее 80% при уровне доверительной вероятности 95%, что, согласно [26], не позволяет выявить статистически значимые коэффициенты корреляции. В этой связи использовалась выборка по всем видам рыб без учета типа водоема, на котором производили отлов. Корреляционный анализ данных удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани рыб, ЯЦО и частота МЯ в эритроцитах показал отсутствие статистически значимой корреляционной связи, $r = 0.43$ ($p > 0.05$) и $r = 0.67$ ($p > 0.05$) соответственно. Зависимость между удельной активностью ^{137}Cs и частотой МЯ в эритроцитах рыб разных видов можно выразить регрессионным уравнением вида: $Y = 0.0005 \times X + 1.1$ ($R^2 = 0.46$, $p > 0.05$), из которого следует, что количество эритроцитов с МЯ увеличивается на 5 клеток на каждые 1000 Бк/кг удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани рыбы.

Таблица 3. Удельная активность ^{137}Cs в мышечной ткани рыб, Бк/кг

Table 3. Specific activity of ^{137}Cs in muscle tissue of fish, Bq/kg

Водоем	Вид рыбы				
	карась	лινь	окунь	плотва	щука
Старое русло р. Припять, 0.64 Бк/л	—	107 ± 29	262 ± 62	142 ± 37	346 ± 81
Николаевский старик, 1.14 Бк/л	81 ± 28	112 ± 31	340 ± 85	636 ± 136	153 ± 44
р. Несвич, 6.60 Бк/л	3650 ± 769	2208 ± 457	—	—	6382 ± 1277
оз. Персток, 8.60 Бк/л	4865 ± 973	2789 ± 504	—	—	—
оз. Жартай, 2.25 Бк/л	—	—	160 ± 53	—	—
оз. Лядо	2139 ± 428	—	—	—	2760 ± 552
—	—	—	—	—	—
оз. Вьюры, 1.13 Бк/л	—	—	326 ± 77	142 ± 55	—

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрический анализ эритроцитов крови рыб, отловленных в водоемах на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника с разным уровнем радиоактивного загрязнения ^{137}Cs , показал, что ЯЦО эритроцитов щуки и карася достоверно отличаются от данных литературных источников, приведенных для водных объектов с фоновым радиационным режимом. В ходе анализа также установлено, что между значениями ЯЦО эритроцитов щуки (0.201 ± 0.023) и карася (0.131 ± 0.005) – пелагического и бентосного хищников, отловленных в проточных и непроточных водоемах, имеет место достоверное различие средних значений ($p < 0.05$). Вместе с тем отсутствие достоверной корреляции между значениями ЯЦО и удельной активностью ^{137}Cs в мышечной ткани рыб не позволяет в полной мере использовать данный показатель для оценки цитогенетического действия радионуклидов.

Согласно исследованиям [23, 24, 27], в ответ на действие различных техногенных факторов среды обитания в эритроцитах возникают мелкие (результат хромосомных aberrаций) и крупные (результат повреждения веретена деления) микроядра, которые могут служить подтверждением генотоксического действия, в том числе источников радиоактивного загрязнения среды обитания. В ходе исследований установлено, что в эритроцитах рыб разных видов наблюдается повышение частоты образования МЯ, в том числе у особой щуки (3.14‰) и карася (2.08‰), отловленных в непроточных водоемах на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника с разным уровнем радиоактивного загрязнения. Значения этого показателя достоверно выше спонтанного уровня, увеличение данного показателя указывает на развитие цитогенетических эффектов, которые находят отражение в клеточном метаболизме и митотической активности эритроцитов рыб, обитающих в условиях радиоактивного загрязнения.

Сравнительный анализ удельной активности ^{137}Cs в мышечной ткани рыб разных видов показал достоверные различия между удельной активностью карася (2684 ± 420 Бк/кг) и окуня (307 ± 44 Бк/кг) ($p = 0.02$), карася (2684 ± 420 Бк/кг) и плотвы (272 ± 28 Бк/кг) ($p = 0.02$), линя (1304 ± 375 Бк/кг) и окуня (307 ± 44 Бк/кг) ($p = 0.03$), линя (1304 ± 375 Бк/кг) и плотвы (272 ± 28 Бк/кг) ($p = 0.04$), окуня (307 ± 44 Бк/кг) и щуки (2410 ± 620 Бк/кг) ($p = 0.03$), плотвы (272 ± 28 Бк/кг) и щуки (2410 ± 620 Бк/кг) ($p = 0.04$). В результате этого удалось разделить рыб исследуемых видов на две группы – сильные аккумуляторы ^{137}Cs : карась, щука и линь; и слабые аккумуляторы ^{137}Cs : окунь и плотва.

В данной связи наиболее репрезентативными видами ихтиофауны водоемов Полесского радиационно-экологического заповедника могут служить пелагический хищник щука обыкновенная и бентофаг карась серебряный, обитающие в непроточных водоемах. Независимо от уровня радиоактивного загрязнения водоема эти виды отличаются сочетанием трех условий – высокая аккумуляция радионуклидов ^{137}Cs в мышечной ткани, сдвиг ЯЦО вправо, который может свидетельствовать о развитии эритроцитоза, и высокая частота МЯ в эритроцитах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузина Т.В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2011. 26 с. [Kuzina T.V. Tsitofiziologicheskie osobennosti krovi promyslovyykh ryb Volgo-Kaspiiskogo kanala [dissertation]. Astrakhan', 2011. 26 p. (In Russian)]
2. Лугаськова Н.В., Найсыров Р.А. Адаптивные особенности системы крови окуня и линя в условиях загрязнения и эвтрофикации водоемов // Сибирский экол. журн. 2001. Т. 8. № 6. С. 735–739. [Lugas'kova N.V., Naisyrov R.A. Adaptivnye osobennosti sistemy krovi okunya i linya v usloviyakh zagryazneniya i evtrofikatsii vodoemov // Sibirskii ekologicheskii zhurnal. 2001. V. 8. № 6. P. 735–739. (In Russian)]
3. Чунихин Л.А., Чеховский А.Л., Дроздов Д.Н. Картирование и оценка радоновой обстановки Гомельской, Могилевской и Витебской областей // Изв. Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины. 2015. № 3 (90). С. 71–76. [Chunikhin L.A., Chekhovskii A.L., Drozdov D.N. Kartirovanie i otsenka radonovoi obstanovki Gomel'skoi, Mogilevskoi i Vitebskoi oblasti // Izvestiya Gomel'skogo gosudarstvennogo universiteta imeni F. Skoriny. 2015. V. 3. № 90. P. 71–76. (In Russian)]
4. Карабанов А.К., Матвеев А.В., Чунихин Л.А. и др. Радон и дочерние продукты распада в воздухе зданий на территории Беларуси // Природопользование. 2015. Вып. 27. С. 49–53. [Karabanov A.K., Matveev A.V., Chunikhin L.A. i dr. Radon i dochernie produkty raspada v vozdukh zdanii na territorii Belarusi // Prirodopol'zovanie. 2015. V. 27. P. 49–53. (In Russian)]
5. Чунихин Л.А., Чеховский А.Л., Дроздов Д.Н. Карта радоновой опасности территории Республики Беларусь // Радиационная гигиена. 2016. Т. 9. № 4. С. 43–46. [Chunikhin L.A., Chekhovskii A.L., Drozdov D.N. Karta radonovoi opasnosti territorii Respubliki Belarus' // Radiatsionnaya gigiena. 2016. V. 9. №4. P. 43–46. (In Russian)]
6. Al-Sabti K., Metcalfe C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water // J. Mutat. Resort. 1995. V. 23. P. 121–135.
7. Cavaş T., Ergene-Gözükara S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment // J. Environ. Mol. Mutagen. 2005. V. 46. № 1. P. 64–70.

8. *Arkhipchuk V.V., Garanko N.N.* Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells // *J. Ecotoxicol. Environ. Safety*. 2005. V. 112. P. 215–221.
9. *Heddele J.A. et al.* Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future // *J. Environ. Molec. Mutagen*. 1991. V. 18. № 4. P. 277–291.
10. *Козинец Г.И., Быкова И.А., Шапранова Э.Д. и др.* Влияние на эритроциты различных экологических факторов по данным интерферометрии эритроцитов // *Гематол. и трансфузиол.* 1987. Т. 32. № 11. С. 39–43. [*Kozinets G.I., Bykova I.A., Shapranova E.D. i dr.* Vliyaniye na eritron razlichnykh ekologicheskikh faktorov po dannym interferometrii eritrotsitov // *Gematologiya i transfuziologiya*. 1987. V. 32. № 11. P. 39–43. (In Russian)]
11. *Иванцов Д.Н., Гулаков А.В.* Радиоактивное загрязнение ихтиофауны водоемов, расположенных на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника // *Изв. Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины*. 2016. № 6 (99). С. 18–23. [*Ivantsov D.N., Gulakov A.V.* Radioaktivnoye zagryazneniye ikhtiofauny vodoemov, raspolozhennykh na territorii Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika // *Izvestiya Gomel'skogo gosudarstvennogo universiteta im. F. Skoriny*. 2016. V. 6. № 99. P. 18–23. (In Russian)]
12. *Костюсов В.Г.* Видовое разнообразие и продуктивность ихтиоценозов малых озер и причины, их определяющие // *Разнообразие животного мира Беларуси: Итоги изучения и перспективы сохранения: Мат. междунар. науч. конф. Минск, 2001.* С. 217–219. [*Kostousov V.G.* Vidovoye raznoobrazie i produktivnost' ikhtiotsenozov malyykh ozer i prichiny, ikh opredelyayushchie // *Raznoobrazie zhyvotnogo mira Belarusi: Itogi izucheniya i perspektivy sokhraneniya: Materialy mezhdunar. nauchnoi konf. (Conf. proc.) Minsk, 2001.* P. 217–219. (In Russian)]
13. *Власов Б.П., Рудаковский И.А., Архипенко Т.В. и др.* Озера Беларуси как формирующая основа природно-ресурсного потенциала территории для хозяйственного использования // *Природопользование: экология, экономика, технологии: Мат. междунар. науч. конф. Минск, 2010.* С. 42–48. [*Vlasov B.P., Rudakovskii I.A., Arkhipenko T.V. i dr.* Ozera Belarusi kak formiruyushchaya osnova prirodno-resurnogo potentsiala territorii dlya khozyaistvennogo ispol'zovaniya // *Prirodopol'zovanie: ekologiya, ekonomika, tekhnologii: Materialy mezhdunar. nauchnoi konf. (Conf. proc.) Minsk, 2010.* P. 42–48. (In Russian)]
14. *Гашев С.Н., Сазонова Н.А., Селюков А.Г. и др.* Методика комплексной оценки состояния сообществ и популяций доминирующих млекопитающих, амфибий и рыб. Тюмень, ТюмГУ, 2005. 94 с. [*Gashev S.N., Sazonova N.A., Selyukov A.G. i dr.* Metodika kompleksnoi otsenki sostoyaniya soobshchestv i populyatsii dominiruyushchikh mlekopitayushchikh, amfibi i ryb. Tyumen': TyumGU, 2005. 94 p. (In Russian)]
15. *Жуков П.И.* Справочник по экологии пресноводных рыб. Минск: Наука и техника, 1988. 310 с. [*Zhukov P.I.* Spravochnik po ekologii presnovodnykh ryb. Minsk: Nauka i tekhnika, 1988. 310 p. (In Russian)]
16. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая пром-сть, 1966. 376 с. [*Pravdin I.F.* Ru-kovodstvo po izucheniyu ryb. M.: Pishchevaya promyshlennost', 1966. 376 p. (In Russian)]
17. *Брюзгин В.Л.* Методы изучения рыб по чешуе, костям и отолитам. — Киев: Наук. думка, 1969. 187 с. [*Bryuzgin V.L.* Metody izucheniya ryb po cheshue, kostyam i otolitam. Kiev: Naukova dumka, 1969. 187 p. (In Russian)]
18. Методические указания по проведению гематологического обследования рыб / Разр. ТИПРО-центр и КаспНИРХ; утв. Минсельхозпродом РФ 02.02.1999. М., 1999. [*Metodicheskie ukazaniya po provedeniyu gematologicheskogo obsledovaniya ryb / Razr. TINRO-tsentr i KaspNIRKh; utv. Minsel'khodzprodrom RF 02.02.1999.* M., 1999. (In Russian)]
19. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1953. 719 с. [*Romeis B.* Mikroskopicheskaya tekhnika. M.: Izdatel'stvo inostrannoi literatury, 1953. 719 p. (In Russian)]
20. *Роскин Г.И., Левинсон Л.Б.* Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1957. 467 с. [*Roskin G.I., Levinson L.B.* Mikroskopicheskaya tekhnika. M.: Sovetskaya nauka, 1957. 467 p. (In Russian)]
21. *Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А.* Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов/Дон: Кн. изд-во, 1989. 112 с. [*Zhiteneva L.D., Poltavtseva T.G., Rudnitskaya O.A.* Atlas normal'nykh i patologicheskii izmenennykh kletok krovi ryb. Rostov-na-Donu: Kn. izd-vo, 1989. 112 p. (In Russian)]
22. Физиология и биохимия водных животных / Отв. ред. Г.М. Чуйко. Ярославль: Канцлер, 2015. Вып. 72 (75). 133 с. [*Fiziologiya i biokhimiya vodnykh zhyvotnykh / Otv. red. G.M. Chuyko.* Yaroslavl': Kantstler. 2015. V. 72 (75). 133 p. (In Russian)]
23. *Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. и др.* Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992. 272 с. [*Il'inskikh N.N., Novitskii V.V., Vanchugova N.N. i dr.* Mikroyadernyi analiz i tsitogeneticheskaya nestabil'nost'. Tomsk: Izd-vo Tomskogo universiteta, 1992. 272 p. (In Russian)]
24. *Кузина Т.В.* Анализ гематологических показателей судака волго-каспийского канала // *Естественные науки номер. Астрахань, 2009.* № 4(29). С. 96–100. [*Kuzina T.V.* Analiz gematologicheskikh pokazatelej sudaka volgo-kaspijskogo kanala // *Estestvennye nauki nomer. Astrahan', 2009.* № 4(29). S. 96–100. (In Russian)]
25. *Иванцов Д.Н., Гулаков А.В.* Накопление и распределение по органам и тканям долгоживущих радионуклидов ¹³⁷Cs и ⁹⁰Sr в организме пресноводных рыб, обитающих в водоемах Полесского государственного радиационно-экологического заповедника // *Изв. Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины. Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины.* 2018. № 6 (111). С. 29–35. [*Ivantsov D.N., Gulakov A.V.* Nakopleniye i raspredeleniye po organam i tkanyam dolgozhivushchikh radionuklidov ¹³⁷Cs i ⁹⁰Sr v organizme presnovodnykh ryb, obitayushchikh v vodoemakh Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika // *Izvestiya Gomel'skogo gosudarstven-*

- nogo universiteta imeni F. Skoriny. 2018. № 6(111). P. 29–35. (In Russian)]
26. *Гржибовский А.М., Горбатова М.А., Наркевич А.Н., Виноградов К.А.* Объем выборки для корреляционного анализа // Морская медицина. 2020. № 6(1). С. 101–106. [*Grzhibovskiy A.M., Gorbatova M.A., Narkevich A.N., Vinogradov K.A.* Ob"yem vyborki dlya korrelyatsionnogo analiza // Morskaya meditsina. 2020 № 6(1). P. 101–106. (In Russian)]
27. *Абилев С.К., Глазер В.М.* Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. М.; СПб.: Нестор-История, 2015. С. 195. [*Abilev S.K., Glazer V.M.* Mutagenез s osnovami genotoksikologii: uchebnoye posobiye. М.; SPb.: Nestor-Istoriya, 2015. 195 p. (In Russian)]

Analysis of Cytogenetic and Cytotoxic Effects of Radiation on Red Blood Cells of Fish Inhabiting in Reservoirs the Territory of Polesky State Radiation-ecological Reserve

A. V. Gulakov^{a,#}, D. N. Drozdov^a, and D. M. Ivantsou^b

^a Francis Skaryna Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus

^b Polesye State Radiation-ecological Reserve, Khoyniki, Republic of Belarus

[#]E-mail: Gulakov.andr@yandex.ru

The article presents the results of morphometric analysis of red blood cells of different fish species living in water bodies on the territory of the Polesky state radiation and ecological reserve. The paper shows that the longitudinal and transverse sizes of red blood cells differ in fish of different species. The size of cells is characterized by low variation, and the EGG is shifted towards the nucleus, which may indirectly indicate the presence of cellular adaptation. The micronucleus test showed a significant difference in the frequency of occurrence of micronuclei in fish of different species, which differ in the method of obtaining food and the content of ¹³⁷Cs in muscle tissue. Analysis of fish blood samples showed that the content of micronuclei in red blood cells of fish of different species was distributed as follows: common pike – $3.14 \pm 0.24\%$, silver carp – $2.08 \pm 0.36\%$, river perch – $1.84 \pm 0.39\%$, tench – $1.26 \pm 0.28\%$, common roach – $1.13 \pm 0.34\%$. The frequency of micronuclei exceeded the upper limit of the spontaneous level, significant differences were found for three species: common pike, silver carp and river perch ($p < 0.05$). Correlation analysis of data on specific activity, SNR, and micronucleus frequency showed no statistically significant correlation, $r = 0.43$ ($p > 0.05$) and $r = 0.67$ ($p > 0.05$). However, there is a trend showing that with an increase in the specific activity of ¹³⁷Cs in muscle tissue, the frequency of micronuclei increases in red blood cells of fish of different species: for 1000 Bq/kg of specific activity, the number of cells with micronuclei increases by five units.

Key words: ichthyofauna, radioactive contamination, muscle tissue, ¹³⁷Cs specific activity, erythrocytes, nuclear cytoplasmic index, micronuclear test

УДК 539.163:574.5:631.4

РАДИОНУКЛИДЫ В ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТАХ И ПРИОЗЕРНЫХ ПОЧВАХ ЭКОСИСТЕМЫ ОЗЕРА МАЛЫЕ КИРПИЧИКИ (ВУРС)

© 2021 г. В. В. Дерягин¹, С. Г. Левина^{1,*}, А. В. Аклеев^{2,3}, А. А. Сутягин¹¹ Южно-Уральский государственный гуманитарно-педагогический университет, Челябинск, Россия² Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, Россия³ Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

*E-mail: serafima_levina@mail.ru

Поступила в редакцию 04.07.2020 г.

После доработки 22.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Для комплексного анализа радиоэкологического состояния озерной экосистемы Мал. Кирпичики использованы стандартные методики отбора проб воды (батометр ГР-18), донных отложений (поршневая трубка Ливингстона, бентосометр С-1) и почв. Радиохимический анализ проб проводился в Институте экологии растений и животных УрО РАН по стандартным радиологическим методикам определения ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs. Установлено, что вода озера имеет удельную активность по ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs ниже уровня вмешательства в 39–40 раз и может быть использована для децентрализованного водоснабжения. Рассчитана скорость осадконакопления донных отложений данного озера. Выявлено, что превышение удельной активности ¹³⁷Cs над ⁹⁰Sr и повышение его биодоступности в донных осадках связаны с образованием на территории ВУРСа Карачаевского радиоактивного следа (1967 г.). Кроме того, различия в современном распределении удельной активности ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs по почвенным разрезам зависят от их месторасположения в элювиальной или супераквальной позиции ландшафта. Разведение растительноядных рыб в озере и выращивание сельскохозяйственной продукции на приозерной территории не рекомендуются.

Ключевые слова: миграция радионуклидов, ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, озерная экосистема, донные отложения озера, Восточно-Уральский радиоактивный след, Карачаевский радиоактивный след

DOI: 10.31857/S0869803121020053

Более 60 лет, прошедших с момента радиационного инцидента 1957 г. на ПО “Маяк”, предполагают нормализацию радиационной обстановки на землях и в водоемах Восточно-Уральского радиационного следа (ВУРСа). Многие озера в настоящее время используются для промыслового разведения рыбы. Однако целесообразность введения в хозяйственный оборот некоторых озер без должного радиоэкологического исследования вызывает опасения. Одно из них – оз. Малые Кирпичики, лежащее на оси следа в 19 км от эпицентра взрыва 1957 г. Многие годы озеро не привлекало особого внимания в связи с его малыми размерами. Тем не менее ранее было показано, что на водоем оказывали воздействие не только аэрозольные выбросы 1957 г., образовавшие ВУРС, но и ветровой разнос радиоактивной пыли с оз. Карачай в 1967 г., образовавший Карачаевский радиационный след (КРС) [1]. Расположенное в 2 км к северо-востоку от него оз. Большие Кирпичики давно стало одним из центров рыбо-разведения в Кунашакском районе, и рыба в нем соответствует нормам радиационной безопасно-

сти по уровню содержания радионуклидов. Однако оз. Малые Кирпичики, расположенное ближе к оси выпадения радиоактивных веществ, требует комплексной радиоэкологической оценки состояния экосистемы озера.

Целью работы является комплексный анализ содержания и особенностей миграции относительно долгоживущих радионуклидов ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs в воде, высшей водной растительности, донных отложениях и приозерной почве экосистемы оз. Малые Кирпичики, находящегося на территории ВУРСа.

По данным, полученным в 2011 г. [2, 3], содержание ⁹⁰Sr в озерной воде составляло 0.2 Бк/л, а ¹³⁷Cs – не более 0,087 Бк/л. В целом по озерам этого сектора ВУРСа был сделан вывод, что вода “может считаться безопасной по содержанию ³H, ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs” [2]. Данные 2003 г. по распределению активности в донных отложениях озера показали, что запасы ⁹⁰Sr в керне мощностью 1,53 м составляют 15.1 кБк/м². При этом 80% активности приходится на слой 0–30 см, а максимально загряз-

ненным слоем является 0–5 см (содержание ^{90}Sr 66.1 Бк). Запасы ^{137}Cs в том же слое составляли 23.9 кБк/м², при этом 80% активности приходилось на слой 0–25 см, а максимально загрязненным являлся сапрпель от 0 до 5 см – 113.4 Бк.

При исследовании макрофитов, произрастающих на водоемах ВУРСа [4, 5], было выявлено отношение некоторых представителей высшей водной растительности к органическому загрязнению, общему эвтрофированию, подкислению вод и загрязнению тяжелыми металлами. Индикаторами загрязнения озера являлись телорез алоевидный и рогоз широколистный [6], которые можно рассматривать в качестве референтных видов при организации биомониторинга данной экосистемы.

Современное состояние почв водосборного бассейна озера отражает несколько этапов антропогенного воздействия. Это сельскохозяйственное использование до радиационной аварии 1957 г., радиоактивное загрязнение 1957 г., мелиоративная вспашка в первые несколько лет после аварии, радиоактивное загрязнение 1967 г. и отсутствие антропогенного воздействия после 1967 г.

Сопоставление динамики плотности загрязнения прибрежных почв для слоя 0–20 см в 1957 и 1997 г. позволило выявить снижение плотности загрязнения на 1–2 порядка. Так, в 1957 г. общая β -активность составляла около 3.7 ТБк/км² (100 Ки/км²), а в 1997 г. по ^{90}Sr от 7.4 до 18.5 ГБк/км² (от 0.2 до 0.5 Ки/км²), по ^{137}Cs – от 18.5 до 3.7 ГБк/км² (от 0.5 до 1.0 Ки/км²) [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Оз. Малые Кирпичики относится к типичным небольшим “степным блюдцам” с плоским дном и глубиной около 3 м, каких много в лесостепи на Зауральском пенеппле. Его координаты N55°50′38.36; E61°0′34.95 (WGS-84). Установлено, что вода в этом озере гидрокарбонатно-магниева, содового типа, имеет минерализацию около 200 мг/л и является пресной.

Для водосборной территории озера характерны черноземные почвы различных модификаций, чаще выщелоченные черноземы [1]. Однако в связи с мелкоконтурностью тектонических и геологических структур на Зауральском пенеппле наблюдается мозаичность природных условий, ведущая, в частности, к разнообразию почвенного покрова. Так, под высокотравными березовыми лесами на плакорах формируются темно-серые лесные почвы, а темногомусовый горизонт черноземов в некоторых случаях имел выраженный коричневый оттенок [7].

В общем случае почвы водосбора озер Зауральского пенеппла по отношению к режиму увлаж-

нения можно подразделить на удаленную от водоема ландшафтную элювиальную (преимущественно плакоры) и супераквальную позиции прибрежных ландшафтов. Элювиальные фации имеют периодически промывной режим и характеризуют усредненное (близкое к среднему по данной природной зоне на данной широте) физико-химическое состояние. Супераквальная позиция обеспечивает почве промывной (при определенном удалении от берега – периодически промывной) и выпотной режимы, а также неглубокое положение грунтовых вод. Поэтому супераквальная позиция характеризует частные состояния почв приозерных территорий. Интересны они в связи с повышенным (относительно элювиальных) плодородием. [8].

Пробы воды отбирали с поверхностных (0.2–0.5 м от поверхности) горизонтов батометром Молчанова ГР–18 (Россия) в трех повторностях (по 20 л на повторность для радиохимического анализа). Отбор проб донных отложений осуществляли с использованием стандартного гидрологического оборудования (в частности, поршневая трубка Ливингстона), позволяющего получать образцы с ненарушенной стратификацией.

Для отбора высшей водной растительности использовали стандартные методики [9]. Отобранные макрофиты сортировали по видовой принадлежности, высушивали при постоянном перемешивании, затем измельчали и озолотили в муфельных печах при температуре 800°C. После озолотения макрофиты подвергали радиохимическому анализу.

Определение места закладки почвенных разрезов основывалось на исследовании особенностей ландшафтных катен и вычленении в них супераквального и элювиального элементов. При выборе мест закладки был проведен анализ времени последнего антропогенного воздействия на почвы (по целостности почвенных горизонтов), выбрана точка с наименьшей вероятностью механического вмешательства. Супераквальные разрезы закладывали не далее 25 м от берега. Элювиальные почвы (суглинок) отбирали на расстоянии 350 м от берега. Почвенный разрез был сделан на возвышенности, котловина водой не заливалась, в верхних горизонтах почва была сухая, рассыпчатая, в нижних горизонтах тяжелый суглинок.

Удельную активность ^{90}Sr в исследуемых образцах определяли на малофоновой β -метрической установке типа УМФ-2000 и пламенно-фотометрическим контролем выхода носителя. Содержание ^{137}Cs исследовали в оксалатах γ -спектрометрическим методом на полупроводниковых детекторах типа ДГДК-100, а также на γ -спектрометре фирмы “CANBERA”. Погрешность измерения ^{90}Sr и ^{137}Cs составляет 20% при активности

0.7×10^{-3} Бк/кг и 10% при больших активностях. Диапазон величины измерения $0.02 \times 10^{-3} - 1 \times 10^2$ Бк/кг. Радиохимический анализ проводили в Институте экологии растений и животных УрО РАН (г. Заречный) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические показатели воды оз. Малые Кирпичики не превышают ПДК для вод нецентрализованного водоснабжения [6]. Уровень вмешательства по ^{90}Sr в воде составляет 11×10^{-3} Бк/м³, по ^{137}Cs — 5×10^{-3} Бк/м³. Фоновые значения ^{90}Sr и ^{137}Cs по Уральскому региону составляют 0.09×10^{-3} и 0.04×10^{-3} Бк/м³ соответственно, что обусловлено их содержанием в глобальных выпадениях на исследуемой территории [7, 8].

Донные отложения представлены типичными в этой природной зоне сапропелями. Для анализа распределения удельной активности ^{90}Sr и ^{137}Cs по профилю донных отложений существенно определено уровня, на котором сейчас находится слой отложений, образовавшийся в год радиоактивной аварии. Слой, в котором находится ил, осевший в год аварии, предположительно соответствует глубине от раздела “вода–отложения” с 28 до 37 см. С момента аварии до 2011 г. (времени отбора проб) прошло 54 года. Следовательно, скорость осадконакопления может быть от 5.2 до 6.85 мм/год. Дополнительный анализ позволяет уточнить горизонт ветрового разноса радиоактивного ила с берегов пересохшего оз. Карачай (1967 г.). Так как со времени разноса прошло 44 года, слой, соответствующий разносу, находится на глубине 23–27 см. Следовательно, скорость осадконакопления может быть от 5.23 до 6.13 мм/год. Исходя из расчетов, наиболее близкими к установленным на высокоэвтрофных озерах ВУРСа скоростям осадконакопления являются значения около 5 мм/год. Следовательно, слой образования ВУРСа лежит на глубине около 28 см, образования КРСа — на уровне 23 см. Период между этими событиями — около 10 лет, что соответствует накопленным 50 мм донных отложений со скоростью около 5 мм/год. Удельная активность попавших в водоем ^{90}Sr и ^{137}Cs соответствовала их соотношению в аварийном облаке выброса 1957 г. — 10 : 2. Образование КРС в апреле 1967 г. резко изменило соотношение долгоживущих радионуклидов, которое составило 3 : 9.

После аварии 1957 г. в водоеме начался процесс природного распределения ^{90}Sr и ^{137}Cs . Вероятно, оба они интенсивно вымывались из почв в водоем, захватывались биотой эвтрофного водоема и переотлагались в донных отложениях соответственно этой интенсивности. Картина миграции ^{90}Sr и ^{137}Cs в глубь донных отложений от горизонта аварии сходна с другими озерами ВУРСа:

удельная активность ^{90}Sr уменьшается резко, активность ^{137}Cs снижается постепенно.

Отношение удельных активностей ^{90}Sr и ^{137}Cs донных отложений, сформировавшихся в аварийный период, соответствует ситуации в озерных экосистемах, расположенных в ближней зоне ВУРСа, и превышает 1. Однако дополнительное внесение долгоживущих радионуклидов в озерную экосистему в 1967 г. изменило соотношение удельных активностей ^{90}Sr и ^{137}Cs и в настоящее время оно <1. Такая зависимость более характерна для озерных экосистем удаленной зоны ВУРСа.

При радиоактивном загрязнении донных отложений в 1957 г. сформировалось соотношение удельных активностей ^{90}Sr и ^{137}Cs > 1, характерное для ближней зоны. Загрязнение в 1967 г. сделало это соотношение характерным для дальней зоны (<1). Поэтому можно было ожидать нетрадиционных значений коэффициентов накопления радионуклидов в донных отложениях относительно воды озера. Данные для построения графика (рис. 1), отражающего изменения значений коэффициентов накопления (K_H) радионуклидов ^{90}Sr и ^{137}Cs донными осадками (ДО) по глубине колонки относительно воды исследуемого озера, рассчитаны по формуле $K_H = (\text{ДО}/\text{H}_2\text{O})$. Главные экстремумы графика отражают горизонт аварии 1957 г. (уровень 28 см), горизонт пылевого разноса 1967 г. (23 см) и миграцию ^{90}Sr и ^{137}Cs в глубь донных отложений (38–63 см). Известно, что в пресных водоемах процессы поглощения ^{90}Sr водной высшей растительностью выражены в большей степени, чем для соленых озер, что приводит к накоплению данного радионуклида в верхних слоях илов после сезонного отмирания биоты. Однако характер динамики K_H ^{90}Sr и ^{137}Cs в верхних слоях ДО вызывает вопрос о биологической доступности внесенного в экосистему озера пылевым разносом ^{137}Cs , который стал мигрировать в разы интенсивнее, чем ^{90}Sr , и почти на порядок интенсивнее того же ^{137}Cs , попавшего в экосистему до ветрового разноса.

Установленный характер динамики K_H ^{90}Sr и ^{137}Cs в верхних слоях ДО (рис. 2) подтверждается выявлением соотношения ^{137}Cs и ^{90}Sr в макрофитах. Так, соотношение $^{137}\text{Cs}/^{90}\text{Sr}$ для рогоза (*Typha latifolia* L.) составило 1.46; для телореза (*Stratiotes aloides* L.) — 2.28; для кубышки (*Nuphar lutea* L.) — 2.09; для водокраса (*Hydrocharis morsus-ranae* L.) — 2.15; для кувшинки (*Nymphaea alba* (L.) Sm.) — 2.52.

В целях мониторинга радиоактивного загрязнения почв водосборной территории оз. Малые Кирпичики были отобраны пробы в супераквальной и элювиальной позициях приозерного ландшафта (табл. 1 и 2).

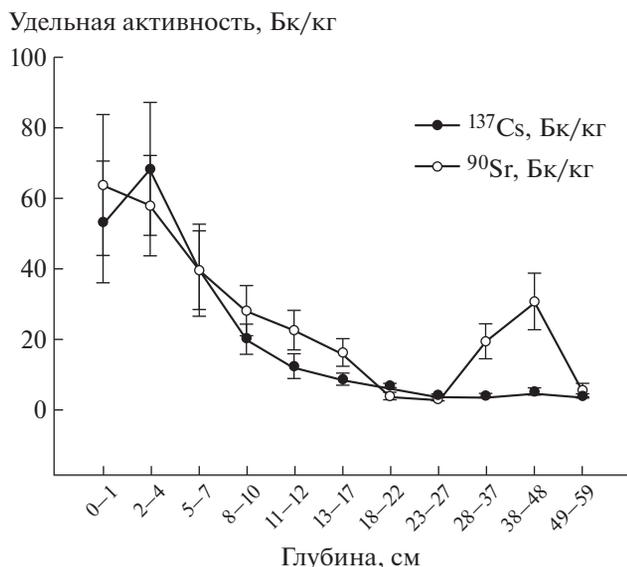


Рис. 1. Изменение удельной активности радионуклидов ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs в почвах супераквальной позиции водосборного ландшафта оз. Мал. Кирпичики.

Fig. 1. Changes in ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs specific activity in the soils of supraquial watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki.

Пробы для анализа физико-химических характеристик элювиальной и супераквальной ландшафтной позиций были взяты из почвенных разрезов, не имевших визуальных следов мелиоративной распашки. Однако при анализе были выявлены последствия этого антропогенного вмешательства. Например, при практически равномерном распределении общего углерода по разрезу элювиальной позиции в горизонте 25–30.5 см гуминовых кислот в 7 раз больше, чем фульвокислот (табл. 3). Возможно, именно этот слой близок к перевернутому в результате вспашки поверхностно загрязненному. Обращает на себя внимание увеличение содержания гумуса, полученного щелочной вытяжкой из горизонтов 20–25 см и 25–30.5 см, до значений, близких современным поверхностным. Эти факты свидетельствуют о проведенной вспашке данного участка незадолго после 1957 г.

В почвенном разрезе супераквальной позиции равномерное уменьшение общего углерода нарушается относительными повышениями содержания на уровне 9.5–12 см, 17–22 см и 27–48 см (табл. 4). Предположительно, это погребенные гумусовые горизонты (перевернутые при мелиоративной вспашке), формировавшиеся в результате периодических подтоплений береговой зоны и мощного развития прибрежной растительности, продуцента гумуса, что характерно практически для всех озер восточного склона Среднего и Южного Урала, а также Зауралья.

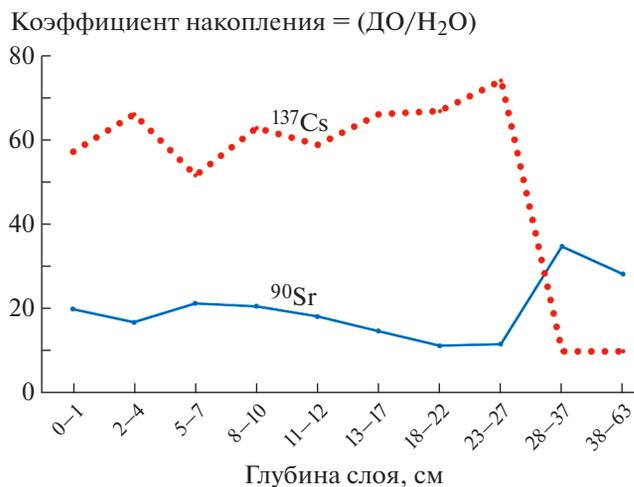


Рис. 2. Значения K_H радионуклидов ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs в верхнем слое донных осадков.

Fig. 2. Values of ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs accumulation factors in the upper layer of the bottom sediments.

Отношение гуминовых кислот к фульвокислотам снижается от 5–9 в поверхностных горизонтах до 1 к низам горизонта В. При существующих режимах увлажнения такая тенденция свидетельствует об аномально высоком содержании гумуса в средних горизонтах разреза. Это может быть следствием мелиоративного перепахивания после аварии 1957 г.

Выявленный в полученных почвенных разрезах гуматный тип почвообразования предполагает малую миграционную способность в них тяжелых металлов. С целью выявления комплекса антропогенного воздействия на почвы водосборной территории оз. Малые Кирпичики оба почвенных разреза были проанализированы на содержание 15 микроэлементов и тяжелых металлов (Cu, Zn, Pb, Cs, Ni, Co, Ba, Sr, Cd, Fe, Mn, K, Na, Ca, Mg). Все элементы, за исключением Ba в почвенном разрезе элювиальной позиции и Mn в разрезе супераквальной позиции, показали незначительное увеличение содержания в горизонте ВС. Содержание Ba в приповерхностных горизонтах разреза на 20% больше, чем в горизонте ВС, содержание Mn – на 58% больше, чем в горизонте ВС. Возможная причина повышения концентрации Mn – участие биоты в формировании верхних почвенных горизонтов хорошо увлажненных приозерных почв. Количественные оценки изменения микроэлементов и тяжелых металлов по горизонтам почвенных разрезов говорят об отсутствии антропогенного воздействия в этом аспекте. При этом интересен факт резкого увеличения в горизонте ВС “элювиального” разреза содержания Ni и природного Cs, а также Cs и Na в том же горизонте “супераквального” разреза. Вероятная причина – небольшие геохимические аномалии кон-

Таблица 1. Краткое описание разреза почвы супер-аквальной позиции ландшафта водосбора оз. Малые Кирпичики**Table 1.** Brief description of the vertical profile of the soil of the supraquial watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki

Горизонт	Глубина, см	Описание
A0	0–1	Лесная подстилка, серая
A1 (1)	2–4	Легкий суглинок, дождевые черви, черно-серый
A1 (2)	5–7	Легкий суглинок, дождевые черви, черно-серый
A2 (1)	8–10	Средний суглинок, серый
A2 (2)	11–12	Средний суглинок, серо-черный
B1 (1)	13–17	Средний суглинок, черно-серый
B1 (2)	18–22	Средний суглинок, черно-серый
B1 (3)	23–27	Средний суглинок, черный
B2 (1)	28–37	Тяжелый суглинок, светло-коричневый
B2 (2)	38–48	Тяжелый суглинок, коричневый
BC	49–59	Тяжелый суглинок, серо-коричневый

Таблица 2. Краткое описание разреза почвы элювиальной позиции ландшафта водосбора оз. Малые Кирпичики**Table 2.** Brief description of the vertical profile of the soil of the eluvial watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki

Горизонт	Глубина, см	Описание
A0	0–4	Степной войлок
A1 (1)	5–6	Легкий суглинок, коричневый
A1 (2)	7–10	Легкий суглинок, темно-коричневый
A1 (3)	11–12	Легкий суглинок, черно-коричневый
A1 (4)	13–16	Легкий суглинок, черно-коричневый
A2 (1)	17–20	Средний суглинок, темно-коричневый
A2 (2)	21–25	Средний суглинок, темно-коричневый
A2 (3)	26–31	Средний суглинок, темно-коричневый
B1	32–35	Средний суглинок, коричнево-серый
B2	36–46	Средний суглинок, серо-коричневый
BC	47–60	Тяжелый суглинок, ярко-коричневый

центрации этих элементов в материнской породе, т.е. геологические условия.

Изменение удельной активности долгоживущих радионуклидов по почвенному профилю элювиальной позиции водосборного ландшафта озера (рис. 3) характеризует несколько событий:

– загрязнение ^{90}Sr и ^{137}Cs в период образования ВУРСа и последовавшее за ним перепахивание почвы с заглублением радионуклидов на уровень 32–35 см;

– миграцию радионуклидов глубже 35 см;

– загрязнение верхних слоев почвы ^{137}Cs и ^{90}Sr в период образования КРСа;

– миграцию радионуклидов КРСа с поверхности в глубь почвы.

Непромывной и периодически промывной режим обусловил относительно равномерное распределение долгоживущих радионуклидов по пахотному профилю почвы элювиальной позиции.

Те же события в почвах супераквальной позиции в связи с наличием промывного и выпотного

режимов привели к иному распределению удельной активности по разрезу (рис. 1):

– загрязнение ^{90}Sr и ^{137}Cs в период образования ВУРСа и последовавшее за ним перепахивание почвы с заглублением радионуклидов на уровень 23–48 см выражается резким “скачком” содержания ^{90}Sr при близком к 0 содержании ^{137}Cs ;

– миграция радионуклидов глубже 48 см не установлена;

– загрязнение верхних слоев почвы (0–7 см) ^{137}Cs и ^{90}Sr в период образования КРСа четко выражено только в слое 2–4 см;

– миграция радионуклидов КРСа с поверхности в глубь почвы не прослеживается.

Вызывают интерес причины поведения долгоживущих радионуклидов в естественной среде почв. Расчеты коэффициента корреляции Спирмена [6] подтвердили существование тесной зависимости между содержанием органического вещества и радионуклидов в почвенном разрезе супераквальной позиции. Получена высокая кор-

Таблица 3. Содержание органического вещества и его фракционный состав (%) в элювиальной позиции почв водосбора оз. Малые Кирпичики**Table 3.** Organic matter content and its fractional composition (%) in the eluvial watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki

	Глубина, см	$C_{\text{общ.}}$	$C_{\text{орг.}}$ (ГВ) щелочной вытяжки (%) к почве	$C_{\text{ГК}}$ (%) к почве	$C_{\text{ФК}}$ (%) к почве	ГК/ФК
Разрез элювиальный	0–6	8.72 ± 0.0073	4.38 ± 0.0623	3.0 ± 0.0365	1.38 ± 0.037	2.2
	6–11	8.65 ± 0.0167	4.86 ± 0.0511	3.0 ± 0.0365	1.86 ± 0.037	1.6
	11–12	8.86 ± 0.0511	3.78 ± 0.0292	3.0 ± 0.0365	0.78 ± 0.0037	3.8
	12–16	8.88 ± 0.0275	3.72 ± 0.0406	3.0 ± 0.0365	0.72 ± 0.0037	4.2
	16–20	8.90 ± 0.0365	3.84 ± 0.0456	3.24 ± 0.0456	0.6 ± 0.037	5.4
	20–25	9.03 ± 0.0109	4.32 ± 0.0406	3.24 ± 0.0456	1.08 ± 0.037	3
	25–30.5	8.87 ± 0.0620	3.84 ± 0.0456	3.36 ± 0.0292	0.48 ± 0.0072	7
	30.5–34	8.65 ± 0.0182	3.3 ± 0.0365	2.4 ± 0.036	0.9 ± 0.0072	2.6
	34–45	8.58 ± 0.0263	1.04 ± 0.3398	1.02 ± 0.037	0.02 ± 0.0066	51
	45–60	8.44 ± 0.0456	1.04 ± 0.3398	0.4 ± 0.0072	0.64 ± 0.0072	0.62

реляция между ^{90}Sr , гуминовыми и фульвокислотами, равная 0.89. Между ^{137}Cs , гуминовыми и фульвокислотами корреляция еще выше – 0.95 и 0.92 соответственно. В почвенном разрезе элювиальной позиции высокая корреляция наблюдается только для пары ^{137}Cs – гуминовые кислоты (0,98). Для пары ^{90}Sr – гуминовые кислоты тенденция заметна (0.63); фульвокислоты ни со ^{90}Sr (0.45), ни с ^{137}Cs (0.4) не коррелируют. Коэффициент корреляции подтверждает контролируемую роль гуматных кислот в почвообразовательных процессах. Возможно, гуматный тип почвы ограничивает миграционный потенциал ^{90}Sr и ^{137}Cs .

ОБСУЖДЕНИЕ

Установленные природные физико-химические показатели воды оз. Малые Кирпичики являются естественными и позволяют использовать ее для децентрализованного водоснабжения, в частности, водопоя скота. Выявленные превышения рН и Mg^{2+} над нормативами действующего СанПиН невелики и обусловлены в данном случае сезонными изменениями в водоеме.

Радиологические исследования воды озера показали, что она имеет удельную активность ниже уровня вмешательства по ^{137}Cs в 40 раз, а по ^{90}Sr в 39 раз. Выявленное трехкратное превышение над фоновыми значениями по Уральскому региону как для ^{90}Sr , так и для ^{137}Cs , также позволяет использовать ее для децентрализованного водоснабжения.

Представляет интерес факт превышения биодоступности ^{137}Cs над ^{90}Sr для изученных макрофитов более чем в 2 раза. Одной из возможных причин этого явления может быть увеличение количества ^{137}Cs в донных отложениях из-за ветрового разноса ила с оз. Карачай и образования КРСа.

Макрофиты в данной озерной экосистеме играют роль компонента, накапливающего радионуклиды из других сред системы и выводящие их из круговорота веществ и энергии в ней. Захоронение происходит в донных отложениях, поэтому одним из условий хозяйственного использования озерной экосистемы озера является покой донных осадков. То есть разведение роющих рыб является нежелательным.

Скорость осадконакопления для оз. Малые Кирпичики составляет около 5 мм/год, что соответствует его уровню эвтрофности в целом и зарастания в частности. Горизонтом аварии 1957 г. (горизонтом образования ВУРСа) является слой 28 см. Горизонтом ветрового разноса радиоактивной пыли 1967 г. (горизонтом образования КРСа) является слой 23 см. Гравитационная миграция ниже горизонта аварии 1957 г. такая же, как и на других озерах, загрязненных долгоживущими радионуклидами. Миграция радионуклидов в вышележащих горизонтах не так очевидна и требует дополнительных исследований.

Явное преобладание ^{137}Cs над ^{90}Sr в верхнем слое донных отложений исследуемого озера возникло из-за добавочного (к выпадениям ВУРСа) воздействия аэрального разноса радиоактивной

Таблица 4. Содержание органического вещества и его фракционный состав (%) в супераквальной позиции почв водосбора оз. Малые Кирпичики
Table 4. Organic matter content and its fractional composition (%) in superaqual watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki

Разрез супераквальный	Глубина, см	$C_{\text{общ.}}$ (%)	$C_{\text{орг.}}$ (ГВ) щелочной вытяжки (%) к почве	$C_{\text{ГК}}$ (%) к почве	$C_{\text{ФК}}$ (%) к почве	ГК/ФК
	0–1	12.3 ± 0.036	3.5 ± 0.037	3.0 ± 0.037	0.6 ± 0.0037	5
1–4	10.1 ± 0.036	3.2 ± 0.037	2.8 ± 0.037	0.4 ± 0.0024	7	
4–7	5.2 ± 0.036	3.0 ± 0.037	2.7 ± 0.037	0.3 ± 0.0013	9	
7–9.5	5.8 ± 0.036	1.4 ± 0.037	1.2 ± 0.037	0.2 ± 0.0072	6	
9.5–12	8.8 ± 0.073	1.0 ± 0.037	0.9 ± 0.0037	0.1 ± 0.0010	9	
12–17	6.5 ± 0.036	0.7 ± 0.037	0.6 ± 0.037	0.1 ± 0.0074	6	
17–22	7.6 ± 0.073	0.3 ± 0.073	0.2 ± 0.0072	0.1 ± 0.0074	2	
22–27	2.6 ± 0.063	0.3 ± 0.037	0.2 ± 0.0072	0.1 ± 0.0074	2	
27–37	3.0 ± 0.036	0.2 ± 0.037	0.1 ± 0.0011	0.1 ± 0.0074	1	
37–48	2.5 ± 0.036	0.2 ± 0.037	0.1 ± 0.0011	0.1 ± 0.0010	1	
48–59	2.3 ± 0.036	0.1 ± 0.037	0.01 ± 0.0002	0.09 ± 0.0066	0.11	

пыли в конце 1960-х годов при образовании КРС. Следовательно, классифицировать удаленность водоемов замедленного водообмена по отношению удельных активностей ^{90}Sr и ^{137}Cs в донных отложениях можно лишь в том случае, если, располагаясь на территории ВУРСа, они не подвергались воздействию аэральных выбросов КРС. Иное соотношение долгоживущих радионуклидов в распространенных ветром пылевидных донных отложениях оз. Карачай (1967 г.) кардинально меняет закономерность, характерную для озер ВУРСа, и требует учета второго этапа загрязнения.

На загрязненной радионуклидами территории можно выделять три области загрязненности: ВУРС, КРС и двойного загрязнения. Поэтому классификация удаленности озер от источника эмиссии по отношению удельных активностей ^{90}Sr и ^{137}Cs в донных отложениях должна иметь, как минимум, три классификационных подразделения: озера в составе ВУРСа; озера в составе КРСа; озера в составе и ВУРСа, и КРСа.

Почвы во всех изученных почвенных разрезах подвергались однократной мелиоративной вспашке после аварии 1957 г. Учитывая результаты физико-химического анализа, можно утверждать, что почвы в месте отбора проб элювиальной позиции ландшафта были вспаханы на глубину около 30 см, супераквальной – на глубину несколько более 30 см.

Загрязнение ^{90}Sr и ^{137}Cs в период образования ВУРСа и последовавшее за ним перепахивание

почвы с заглублением радионуклидов создало “всплеск” удельной активности ^{90}Sr для элювиальной позиции на уровне 32–35 см, для супераквальной – 23–48 см при значительной активности ^{137}Cs для элювиальной и практически нулевой –

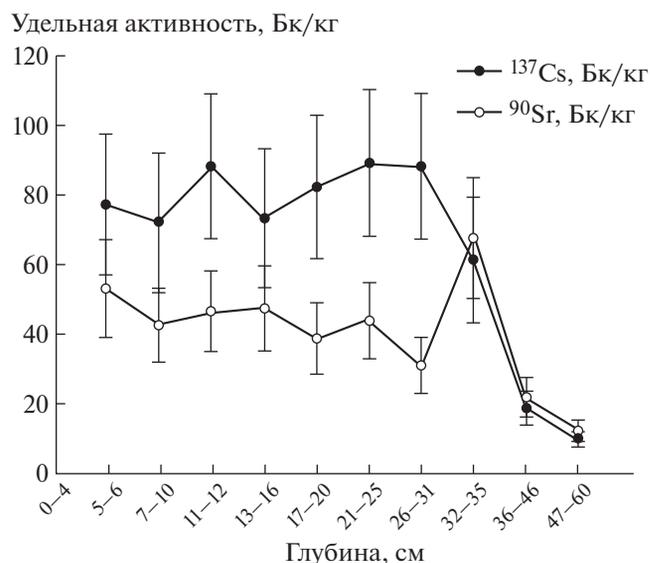


Рис. 3. Изменение удельной активности радионуклидов ^{90}Sr и ^{137}Cs в почвах элювиальной позиции водосборного ландшафта оз. Мал. Кирпичики.

Fig. 3. Changes in ^{90}Sr and ^{137}Cs specific activity in the soils of eluvial watershed landscape of the lake Malye Kirpichiki.

для супераквальной позиции. Миграция ниже этих уровней слабо выражена для элювиальной и не установлена для супераквальной позиции почвенного профиля.

Загрязнение верхних слоев почвы ^{137}Cs и ^{90}Sr в период образования КРСа для элювиальной позиции выражено в слое 0–12 см, для супераквальной – только в слое 2–4 см. Миграция долгоживущих радионуклидов после образования КРС ярко выражена в профиле почвы элювиальной позиции, и ее следы отсутствуют в профиле почвы супераквальной позиции. Причина тому – чередование по сезонам года промывного и выпотного режимов увлажнения почвы супераквальной позиции.

ВЫВОД

Таким образом, анализ радиоэкологического состояния экосистемы оз. Малые Кирпичики позволяет утверждать, что наибольшие опасения вызывают донные осадки и приозерные почвы. Приоритетное использование озер в данном регионе – рыбохозяйственное и (для водосборных территорий) сельскохозяйственное. Разведение растительных рыб, проводящих значительное время в контакте с донными отложениями и питающихся их компонентами, для этого озера не рекомендуется. Выращивание сельскохозяйственной продукции на почвах приозерной территории также нежелательно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья подготовлена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО “МГПИ им. М.Е. Евсевьева” по договору на выполнение НИР от 01.06.2020 г. № 16-293 от 01.06.2020 г. по теме “Техногенные поллютанты в природных экосистемах как фактор активизации когнитивного аспекта социализации студентов в экологических экспедициях”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экологические и медицинские последствия радиационной аварии 1957 года на ПО “Маяк” / Под ред. А.В. Аклеева, М.Ф. Киселева. М.: ГУП Вторая типография ФУ “Медбиоэкстрем” при Минздраве РФ, 2001. 296 с. [Ehkologicheskie i meditsinskie posledstviya radiatsionnoi avarii 1957 goda na PO “Mayak” / Pod red. A.V. Akleeva, M.F. Kiseleva. M.: GUP Vtoraya tipografiya FU “MedbioehkstreM” pri Minzdrave RF, 2001. 296 s. (In Russian)]
2. Казаченок Н.Н., Костюченко В.А., Попова И.Я. и др. Современные уровни радиоактивного загрязнения объектов окружающей среды ВУРС и других территорий в зоне влияния ПО “Маяк” // Вопр. радиац. безопасности. 2014. Т. 73. № 1. С. 33–48. [Kazachenok N.N., Kostyuchenko V.A., Popova I.Ya., et al. Sovremennyye urovni radioaktivnogo zagryazneniya ob"ektov okruzhayushchei sredy VURS i drugikh territorii v zone vliyaniya PO “Mayak” // Voprosy radiatsionnoi bezopasnosti. 2014. V. 73. №. P. 33–48. (In Russian)]
3. Казаченок Н.Н., Попова И.Я., Мельников В.С. и др. Радиоактивное загрязнение воды озер на территории Южно-Уральской техногенной биогеохимической провинции радиоактивных изотопов // Вода: Химия и экология. 2014. № 10. С. 16–22. [Kazachenok N.N., Popova I.Ya., Mel'nikov V.S., et al. Radioaktivnoe zagryaznenie vody ozer na territorii Yuzhno-Ural'skoi tekhnogennoi biogeokhimicheskoi provintsiy radioaktivnykh izotopov // Voda: Khimiya i ehkologiya. 2014. № 10. P. 16–22. (In Russian)]
4. Аклеев А.В. и др. Современное состояние экосистем водоемов В–11, В–10, В–4, В–17 и В–9 ПО “Маяк” / Под ред. А.В. Аклеева, М.Ф. Киселева. М.: ГУП Вторая типография ФУ “Медбиоэкстрем” при Минздраве РФ, 2001. 294 с. [Akleev A.V. i dr. Sovremennoe sostoyanie ehkosistem vodoemov V–11, V–10, V–4, V–17 i V–9 PO “Mayak” / Pod red. A.V. Akleeva, M.F. Kiseleva. M.: GUP Vtoraya tipografiya FU “MedbioehkstreM” pri Minzdrave RF, 2001. 294 s. (In Russian)]
5. Казаченок Н.Н., Попова И.Я. Динамика радиоактивного загрязнения растительности водных экосистем различных типов на Южном Урале // Вода: Химия и экология. 2017. № 6. С. 3–14. [Kazachenok N.N., Popova I.Ya. Dinamika radioaktivnogo zagryazneniya rastitel'nosti vodnykh ehkosistem razlichnykh tipov na Yuzhnom Urale // Voda: Khimiya i ehkologiya. 2017. № 6. P. 3–14. (In Russian)]
6. Каблова К.В., Дерягин В.В., Левина С.Г., Сутягин А.А. Накопление радионуклидов ^{90}Sr и ^{137}Cs в компонентах вода–донные отложения–макрофиты озера Малые Кирпичики // Радиационная биология. Радиоэкология, 2014. Т. 54. № 6. С. 650–656. [Kablova K.V., Deryagin V.V., Levina S.G., Sutyagin A.A. Nakoplenie radionuklidov ^{90}Sr i ^{137}Cs v komponentakh voda–donnyye otlozheniya–makrofity ozera Malye Kirpichiki // Radiatsionnaya biologiya. Radioehkologiya. 2014. V. 54. № 6. P. 650–656. (In Russian)]
7. Молчанова И.В., Караваяева Е.Н., Михайловская Л.Н. Радиоэкологические исследования почвенно-растительного покрова. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 89 с. [Molchanova I.V., Karavaeva E.N., Mikhailovskaya L.N. Radioehkologicheskie issledovaniya pochvenno-rastitel'nogo pokrova. Ekaterinburg: URO RAN. 2006. 89 p. (In Russian)]
8. Молчанова И.В., Караваяева Е.Н. Эколого-геохимические аспекты миграции радионуклидов в почвенно-растительном покрове. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. 159 с. [Molchanova I.V., Karavaeva E.N. Ehkologo-geokhimicheskie aspekty migratsii radionuklidov v pochvenno-rastitel'nom pokrove. Ekaterinburg: URO RAN, 2001. 159 p. (In Russian)]
9. Катанская В.М. Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР. Л.: Наука, 1981. – 87 с. [Katanskaya V.M. Vysshaya vodnaya rastitel'nost' kontinental'nykh vodoemov SSSR. L.: Nauka, 1981. 187 p. (In Russian)]

Radionuclides in the Major Components and Lakeside Soils of the Ecosystem of the lake Malye Kirpichiki (EURT)

V. V. Deryagin^a, S. G. Levina^{a,#}, A. V. Akleyev^{b,c}, and A. A. Sutyagin^a

^a South Ural State Humanitarian Pedagogical University, Chelyabinsk, Russia

^b Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

^c Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

[#] E-mail: serafima_levina@mail.ru

Standard methods of water (Molchanov water sampler GP18), lake sediment (the Livingstone-type drive rod piston corer and bentometer C-1) and soil sampling were used to perform a comprehensive study of the radioecological status of the Lake Malye Kirpichiki ecosystem. Radiochemical analysis of the samples was carried out at the Institute of Plant and Animal Ecology of the Russian Academy of Sciences using standard radiological methods of ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs determination. It was observed that ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs specific activity of the lake water was 39–40 times lower than the intervention limit and could be used for non-public water supply. The sedimentation rate of the bottom sediments of the given lake was calculated. It was revealed that the increase in ¹³⁷Cs specific activity relative to that of ⁹⁰Sr and increase in its bioavailability in lake sediments was associated with the formation of the Karachai Radioactive Trace (1967) in the territory of the EURT. Moreover, the differences in the current distribution of ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs specific activity by soil profile cut depend on their location in eluvial or supraequal watershed landscape. Herbivorous fish farming in the lake and crop growing in the lakeside territory are not recommended.

Keywords: radionuclide migration, ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, lake ecosystem, lake sediments, East Urals Radioactive Trace, Karachai Radioactive Trace

ИСТОРИЯ НАУКИ

УДК 575:57.08:612.014.482:539.1.047

НА ЗАРЕ РАДИАЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ¹

© 2021 г. Г. Б. Смирнов^{1,*}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

*E-mail: smirngb@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.11.2020 г.

После доработки 10.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Обсуждаются события, люди и эксперименты, связанные с первыми шагами на пути изучения механизмов, определяющих устойчивость и чувствительность бактерий к радиационным воздействиям.

Ключевые слова: радиационная чувствительность, радиационная устойчивость, УФ-свет, репаративные системы, бактерии, генетический контроль

DOI: 10.31857/S0869803121020144

Сначала нам нужно определиться, что именно мы будем сегодня обсуждать. Дело в том, что предмет науки радиационной генетики отечественные и зарубежные ученые определяют по-разному. Согласно Большой медицинской энциклопедии (БМЭ) “Радиационная генетика – раздел генетики и радиобиологии, посвященный изучению закономерностей и механизмов возникновения наследственных изменений (мутаций) под действием ионизирующего излучения с целью разработки путей управления этим процессом”. При этом заметьте, речь идет исключительно об ионизирующей радиации. Однако многие исследователи считают, что радиационная генетика должна также заниматься изучением влияния на генетический материал и неионизирующих излучений (ультрафиолетового и видимого света, ультракоротких радиоволн, лазерного излучения и т. д.). Более того, ваш покорный слуга уверен в том, что важнейшим и интереснейшим разделом радиационной генетики является изучение генетических механизмов, обеспечивающих устойчивость или чувствительность организмов к радиации. Давайте с этого и начнем.

9 марта 1921 года в Нью-Йорке, в еврейской семье эмигрантов из России родилась девочка. Ее назвали Эвелина. Сначала они жили на Манхэттене, потом в Квинсе. Это были относительно недавние эмигранты. Семья Майзель, видимо, была вынуждена эмигрировать, поскольку мама Эвелины в России каким-то образом была вовлечена в революционную деятельность. Каким

именно, мы не знаем и, скорее всего, об этом не узнаем никогда. Но сведения достоверные – мне об этом говорила сама Эвелина.

Девочка подрастала, в 16 лет поступила в университет Нью-Йорка и в 1941 году защитила степень бакалавра. Собиралась там и продолжить работать, но, видимо, наследственность сыграла свою роль, и Эвелина оказалась вовлеченной в студенческие волнения по поводу ущемления в правах цветных студентов. Вынужденно переместилась в Колумбийский университет, где защитила степень Мастер дегри и в 1943 году вышла замуж за психолога Германа А. Виткин. Так появилась Е.М. Witkin (рис. 1). Сначала я думал, что буква “М” в инициалах это второе имя, например, Эвелина-Мария, или что-то в этом роде, и только позже я узнал, что “М” обозначает девичью фамилию – Майзель.

А почему, собственно, так подробно об Эвелине Виткин? А потому, что именно она положила начало радиационной генетике в той ее важнейшей части, которая касается генетических механизмов радиочувствительности. Подчеркиваю, начало не радиобиологии (там свои основоположники), а именно радиационной генетике.

В Колумбийском университете она оказалась “под крылом” великого человека – американца российского происхождения (род. в Подольской губернии) Феодосия Григорьевича Добржанского (рис. 2), дальнего потомка Ф.М. Достоевского (мать – внучатая племянница Достоевского). Он изучал генетику и эволюцию на модели дрозофилы. В том же 1943 году Добржанский поручил Эвелине сделать для студентов доклад об экспериментах Лурия и Дельбрюка. Кстати, за этот эксперимент авторы получили Нобелевскую премию.

¹ По материалам лекции, прочитанной на открытии XIX Международной молодежной научной школы им. А.С. Саенко в 2019 г.



*Evelyn
Witkin*

Рис. 1. Е.М. Виткин.
Fig.1. E.M. Witkin.

Так для Э. Виткин началась генетика бактерий. Добржанский знаменит своим историческим высказыванием: “Ничто в биологии не имеет смысла иначе, чем в свете эволюции”. И это совершенно верно.

Эвелина на лето переехала в Колд Спринг Харбор. В этой крупной лаборатории и тогда, и сейчас работали и работают лучшие умы планеты. Она не захотела продолжать “линию” Добржанского, т.е. работать с дрозофилой, а под впечатлением от эксперимента Лурия–Дельбрюка решила использовать в качестве модели кишечную палочку. Это что касается объекта исследования. Но был еще один момент. Выбор направления. И вот здесь мы подошли к парадоксам. Все-таки генетика! Повлиял Добржанский? Да. Но был еще один человек, оказавший влияние на этот выбор. И этим человеком, вот в чем парадокс, был Трофим Лысенко. Виткин мечтала управлять наследственностью. Занялась экспериментом. Ей захотелось выделить из *Escherichia coli* мутант, более устойчивый к радиации, чем исходный штамм. Приспособить кишечную палочку к радиации. Приучить. Воспитать. И она его выделила. В качестве мутагенного воздействия был выбран ультрафиолет. Благо, далеко ходить не пришлось.

Она назвала мутант *Escherichia coli* В/г. По устойчивости к ультрафиолету он был практически неотличим от *Escherichia coli* К12. Но от ис-



Рис. 2. Феодосий Григорьевич Добржанский.
Fig. 2. Theodosius Grigor'evich Dobzhansky.

ходного *Escherichia coli* В он очень отличался (рис. 3). Это был первый в мире радиорезистентный мутант бактерий. Статья была опубликована в 1947 году [1].

Собственно, это и было рождением радиационной генетики в той ее части, которая посвящена изучению радиочувствительности и радиорезистентности.

А теперь давайте подумаем, что было бы, если бы Виткин взяла в качестве исходного штамма не *Escherichia coli* В, а *Escherichia coli* К12. Ничего не было бы. Не получился бы радиорезистентный мутант. А на *Escherichia coli* К12 всего за год до этого в 1946 г. Джошуа Ледерберг с Эдвардом Тэйтумом уже показали возможность конъюгации [2]. (Это Нобелевская премия). Конъюгация — инструмент генетического анализа. Это означало, что, во всяком случае, в то время ставить генетические эксперименты на К12 было уже можно, а на В — еще нет. Что же, Виткин ошиблась с выбором объекта? Это была тупиковая ветвь? Получается, что нет, получается, что счастливая звезда. Да, кстати, если бы Ледерберг и Тэйтум в поисках конъюгации взяли *Escherichia coli* В, то у них тоже ничего не получилось бы. Интересно, как же везет гениям!

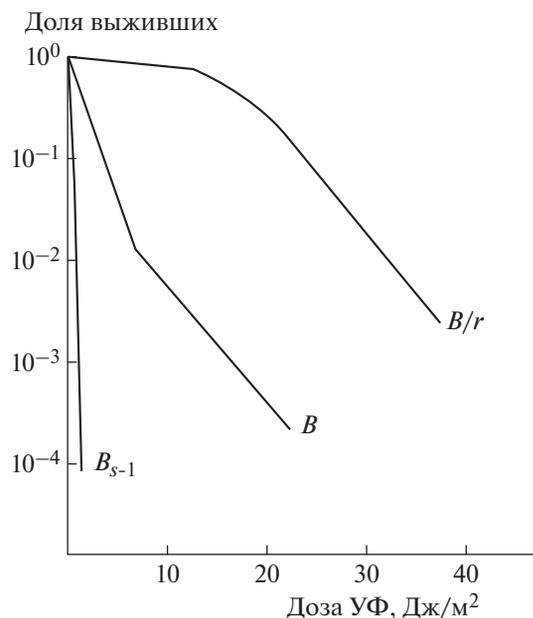


Рис. 3. УФ-чувствительность штаммов *Escherichia coli* B, B/r и B_{s-1}.

Fig. 3. UV-sensitivity of *Escherichia coli* B, B/r and B_{s-1} strains.

Известно, что идеи носятся в воздухе и, если можно выделить мутант, устойчивый к радиации, то почему бы не попытаться выделить мутант чувствительный. Это было сделано в 1958 г. И сделала это опять женщина. Ее звали Руфь Хилл. Она в качестве исходного штамма тоже взяла *Escherichia coli* B. Но, как мы увидим позже, этот случай оказался скорее несчастным, чем счастливым. Первый радиочувствительный мутант получился “на загляденье”. Хилл назвала его B_{s-1} (рис. 3) [3].

В этом опыте Хилл так же, как и Виткин при получении радиорезистентного мутанта, в качестве мутагена использовала ультрафиолет, которым облучала суспензию *Escherichia coli* B. Выжившие бактерии образовали всего 12 колоний. Одна из этих колоний и состояла из мутантных бактерий *Escherichia coli* B_{s-1}. И, как мы увидим чуть позже, натворил этот мутант много если не бед, то уж, во всяком случае, способствовал формированию ложных выводов.

Почему *Escherichia coli* B/r был устойчив к радиации, а *Escherichia coli* B_{s-1} — сверхчувствителен, никто тогда не знал. Но довольно скоро всем все “стало понятно”. В те времена бывший студент профессора биофизики Дика Сетлоу (R.V. Setlow) (рис. 4) Фил Хэнзуолт (P.C. Hanawalt) переехал из Нью Хэйвена (Йельский университет) в Стэнфорд (Стэнфордский университет) и занялся влиянием основных фотопродуктов при УФ-облучении — циклобутановых пиримидиновых димеров на продвижение репликативной вилки.



Рис. 4. Р.В. Сетлоу (через несколько десятилетий после описываемых событий).

Fig. 4. R.V. Setlow (several decades after described events).

Фил обнаружил, что после УФ-облучения в ДНК бактерий дикого типа образуются короткие “заплатки” из вновь синтезированной ДНК. Он позвонил своему бывшему наставнику в Нью Хэйвен и сообщил об этом.

Сетлоу ответил, что он только что обнаружил, что после облучения пиримидиновые димеры в бактериях дикого типа выщепляются из ДНК и переходят в кислоторастворимую фракцию, а вот в мутанте Руфи Хилл *Escherichia coli* B_{s-1} этого не происходит [4]. Хилл тогда тоже находилась в Йельском университете. Именно она любезно поделилась с Диком Сетлоу своим мутантом. Таким образом, первый этап эксцизионной репарации — выщепление пиримидиновых димеров — был открыт [5].

Но ни Хэнзуолт, ни Сетлоу не были генетиками. А вот Пол Говард-Фландерс и его сотрудники, работавшие в том же Йельском университете, были генетиками. Они выделили свои УФ-чувствительные мутанты, но уже из *Escherichia coli* K12, и не только выделили, но и картировали мутантные гены, и показали, что их мутанты также не способны удалять из ДНК пиримидиновые димеры. Мутантные гены были названы *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* [6]. Примечательно, что эти работы группы

Таблица 1. Генотипы *E. coli* В и ее мутантов по Гринбергу [7]**Table 1.** Genotypes of *E. coli* В and its mutants according J. Greenberg [7]

Гены	<i>E. coli</i> В	<i>E. coli</i> В/г	<i>E. coli</i> В _{s-1}
<i>lon</i> (<i>fil</i>)	–	–	–
<i>Sul</i>	+	–	+
<i>uvr</i> (<i>hcr</i>)	+	+	–
<i>lex</i> (<i>exr</i>)	+	+	–

Сетлоу и группы Говарда-Фландерса были опубликованы в одном номере одного и того же журнала. Процесс восстановления ДНК после УФ-облучения был назван эксцизионной репарацией. Сейчас функции каждого из первых трех генов *uvr* тщательно изучены биохимически.

(Нужно сказать, что “за исследование механизмов восстановления ДНК” в 2015 году присудили Нобелевскую премию. Ее получили Томас Роберт Ліндаль, Азиз Санджар и Пол Модрич. По-моему, это очень странное решение. Почему “за исследование”, а не за открытие феномена? (Механизмы восстановления ДНК изучали десятки, если не сотни исследователей, а честь открытия феномена принадлежит, все-таки, Сетлоу, Говарду-Фландерсу и Хэнэуолту.)

Совершенно логичен следующий вопрос: какие повреждения, кроме пиримидиновых димеров, способна узнавать и удалять эксцизионная репарация? В то время далеко не все повреждения, вызываемые в ДНК различными химическими агентами, были известны. Поэтому простейший способ хотя бы предварительно определить диапазон действия эксцизионной репарации состоял в сравнении чувствительности к тому или иному агенту бактерий штамма дикого типа и его радиочувствительного мутанта. И все бы ничего для начала, но многие исследователи стали сравнивать *Escherichia coli* В/г с *Escherichia coli* В_{s-1}. Причем в целом ряде случаев *Escherichia coli* В_{s-1} сравнивали даже не с В/г, а с и вовсе неродственной, но радиорезистентной *Escherichia coli* TAU-bar. И грешили этим очень многие уважаемые ученые. Что тут началось! Сколько статей! В результате “оказалось”, что эксцизионная репарация оперирует чуть ли не на всех мыслимых повреждениях. А дело было в том, что *Escherichia coli* В_{s-1}, действительно, чувствительна практически ко всем воздействиям на свете. И причина, чаще всего, не в эксцизионной репарации.

Разобраться в этой заварухе удалось профессору Джозефу Гринбергу из Пало Альто [7]. Низкий ему поклон за это. Ценой огромного терпения, настойчивости и профессионализма ему удалось адаптировать генетические методы, в первую очередь, трансдукцию фагом P1 для *Escherichia coli* В.

Что же выяснил Гринберг? Очень много неожиданного. Оказалось, что, хотя бактерии *Escherichia coli* В/г фенотипически неотличимы от *Escherichia coli* К12 дикого типа, штамм *Escherichia coli* В/г не дикий тип, а супрессорный мутант *Escherichia coli* В. Тогда, надо понимать, что *Escherichia coli* В – дикий тип? Тоже не совсем верно – он, действительно, дикий, но он природный мутант. А что же *Escherichia coli* В_{s-1}? А это не только мутант по эксцизионной репарации, но множественный мутант по генам, влияющим на радио- и не только радиочувствительность (табл. 1).

Итак, в природе существует стабильная линия *Escherichia coli* В. (Нужно сказать, что, судя по всему, популяция *Escherichia coli* В гетерогенна и состоит как минимум из двух компонентов. Большинство бактерий по радиочувствительности – типичные *Escherichia coli* В, однако существует минорная фракция, примерно 2%, радиочувствительность которой идентична *Escherichia coli* В/г. (При этом радиорезистентность В/г-подобной фракции – признак фенотипический, т.е. не зафиксирован в геноме.) У *Escherichia coli* В дефектен ген *lon*, продуктом которого является сериновая протеиназа. Эти бактерии умеренно УФ-чувствительны, однако, что важно, они чувствительны не только к УФ-, но и к рентгеновским и γ -лучам, и практически ко всем радиомиметикам. После облучения или обработки ДНК-тропными агентами эти бактерии образуют нити (филаменты), так как у них среди множества процессов нарушен процесс клеточного деления из-за дефекта протеолиза неправильно свернутых или агрегированных белков. Одним из субстратов протеазы *Lon* является продукт гена *sul* – ингибитор клеточного деления. Если бактерии, дефектные по гену *lon*, облучить или обработать радиомиметиком, синтезируемый продукт гена *sul* индуцируется, но не разрушается, ингибитор накапливается, клетка не делится, а образует нить и вскоре гибнет [8–10]. Э. Виткин в 1947 году инактивировала у *Escherichia coli* В ген *sul* и получила УФ-резистентный супрессорный мутант *Escherichia coli* В/г. Мутант Хилл *Escherichia coli* В_{s-1} сохранил мутацию в гене *lon* и дополнительно приобрел мутации в генах *uvr* и *lex*, а это означает выключение более 20 генов SOS-регулона! Как я уже говорил – мутант “на загляденье”. А теперь вспомним, что в свое время, сравнивая *Escherichia coli* В/г (или TAU-bar) и В_{s-1}, очень видные ученые делали выводы о диапазоне действия системы именно эксцизионной репарации, оперирующей на пиримидиновых димерах. А ведь возможности для корректного сравнения были. Помимо В_{s-1}, Хилл выделила из *Escherichia coli* В еще несколько УФ-чувствительных мутантов. (Помните 12 колоний из выживших после облучения в ее опыте?) Эти мутанты тоже были названы В_s, но под другими номерами, (например,

V_{s-2}). Они были не настолько чувствительны к УФ-свету, как V_{s-1} , но некоторые из них не были способны реактивировать УФ-облученный бактериофаг T1. То есть не были способны к host cell реактивации (HCR). А это и есть одно из фенотипических проявлений эксцизионной репарации, обусловленных мутацией в любом из трех генов *uvr*. Один из этих мутантов и нужно было сравнить с *Escherichia coli* B для определения диапазона действия системы эксцизионной репарации. Немного позже можно было воспользоваться *uvr* мутантом *Escherichia coli* B/r – WP2 *uvr*⁻, сравнивая его с *Escherichia coli* B/r.

Так что же, кроме пиримидиновых димеров, узнает и выщепляет эксцизионная репарация? Значительную часть моей кандидатской диссертации составили эксперименты по определению диапазона действия эксцизионной репарации. Я был аспирантом Аделины Генриховны Скарронской. Мы изучали летальное и мутагенное действие различных химических мутагенов на модели *uvr* мутантов *Escherichia coli* K12, выделенных в лаборатории А. Рерша в Нидерландах. В качестве контроля и сравнения использовали ультрафиолет. Эти опыты мы проводили в 1967 и 1968 г. Кратко суммировать результаты можно следующим образом. Дефект по первому этапу эксцизионной репарации приводит к увеличению чувствительности бактерий к летальному, но не мутагенному действию бифункциональных алкилирующих агентов. Иными словами, эксцизионная репарация распознает и репарирует искажения вторичной структуры ДНК. Никакие другие повреждения (кроме вызванных ультрафиолетом) *uvr*ABC-зависимой системой не репарируются [11]. Однако позже стало известно, что существуют системы репарации, которые оперируют на самых разнообразных повреждениях ДНК, вызываемых химическими агентами. Теперь эти системы хорошо изучены.

Какие же выводы необходимо сделать из всех этих историй? Конечно, не следует работать со штаммами, не изученными генетически. Можно совершить массу ложных открытий. Но вот вопрос, а достаточно ли генетических характеристик, чтобы быть уверенным в результатах такой работы? Теперь становится понятным, что нет, недостаточно. Буквально в последние годы мы с коллегой занялись экспериментами на модели мутантов, выделенных из штамма *Escherichia coli* K12 AB 1157. Именно из этого исходного штамма Говард-Фландерс и его сотрудники получали мутанты по геном комплекса 3R (репарация, репликация, рекомбинация). Мы стали работать с мутантами по генам *uvrB*, *recA* и *lexA*. Они были получены в 1960-е годы и за всю последующую историю с этими мутантами выполнены многие сотни работ. И вот, в какой-то момент Елена Ни-

колаевна Ильина сказала мне: “Георгий Борисович, Вы работаете с плохо изученными штаммами. Необходимо провести их полногеномное секвенирование”. Я довольно долго “тянул время”, думая, что уж эти штаммы называть плохо охарактеризованными никак нельзя. В конце концов секвенирование провели [12]. Хорошо, что не получилось, как с V_{s-1} , но очевидно, что никто не мог ожидать, что после однократной обработки мутагеном в каждом из геномов *recA* и *lexA* мутантов возникнет около двух сотен мутаций. Здесь обошлось без драматических событий, но все-таки получается, что выдающиеся ученые всего мира многие десятилетия не имели достаточной информации о геномах штаммов, с которыми они работали.

А теперь вернемся к предметам исследований радиационной генетики. В начале нашей беседы мы говорили о том, что радиационная генетика – “раздел генетики и радиобиологии, посвященный изучению закономерностей и механизмов возникновения наследственных изменений (мутаций) под действием ионизирующего излучения с целью разработки путей управления этим процессом”. Не чувствуете диссонанса, дисгармонии в этом определении? Смотрите, первая часть: “...изучению закономерностей и механизмов возникновения наследственных изменений (мутаций)...” вполне соответствует канонам фундаментальной науки, цель которой – получение новых знаний. Однако окончание фразы: “...с целью разработки путей управления этим процессом” ставит вполне определенную и в чистом виде прикладную цель. В одном определении цели для разных наук! И получается, что кроме управления процессом делать ничего не нужно. Налицо явное, искусственно заданное ограничение. Однако продолжим. Определение БМЭ диктует нам необходимость изучения мутагенного действия ионизирующей радиации.

Нужно сказать, что этот раздел радиационной генетики имеет даже более длинную историю, чем генетика радиорезистентности, с которой мы начали. В 1925 году российские исследователи Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов получили мутации у дрожжей после их облучения γ -лучами. Однако за рубежом честь первооткрывателя мутагенного действия радиации принято отдавать Г. Меллеру. Он работал с дрозофилой и в 1927 году показал на этом объекте мутагенное действие рентгеновских лучей. Годом позже Л. Стадлер подтвердил данные Меллера, работая с ячменем. Герман Меллер был яркой, нестандартной личностью: ученик Томаса Ханта Моргана, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1946), в 1933 году он был избран членом-корреспондентом АН СССР. 24 сентября 1948 года он направил в адрес АН СССР письмо с отказом от звания в знак протеста против преследования генетики в



Рис. 5. Александр Николаевич Промптов.
Fig. 5. Alexander Nikolaevich Promptov.

СССР. АН СССР в нетипичной для себя манере вопрос обсуждала недолго, очень оперативно удовлетворила его просьбу, и в январе 1949 года он был лишен звания, которое было восстановлено только в 1990 г. Мне не известны другие случаи отказа от академического звания.

А как же с неионизирующими излучениями? Ведь такой огромный пласт науки как открытие и изучение репаративных процессов возник благодаря работам с УФ-светом. Кто открыл мутагенное действие УФ-света? Хорошо, если кто-то из читателей может ответить на этот вопрос.

А сделал это наш соотечественник, орнитолог Александр Николаевич Промптов (рис. 5). Был он двоюродным племянником Александра Сергеевича Серебровского. О Серебровском просто необходимо сказать хотя бы несколько слов. В 1914 году он закончил физико-математический факультет Московского университета и сразу же оказался на фронте. По окончании Первой Мировой войны по предложению Николая Константиновича Кольцова стал руководителем отдела генетической станции в Московской области. В 1929 году вышла его книга “Антропогенетика и евгеника в социалистическом обществе” [13]. В ней он писал: “Решение вопроса по организации отбора в человеческом обществе, несомнен-

но, будет только при социализме после окончательного разрушения семьи, перехода к социалистическому воспитанию и отделения любви от деторождения. Мы полагаем, что решением вопроса об организации отбора у человека будет распространение получения зачатия от искусственного осеменения **рекомендованной** спермой, а вовсе не обязательно от любимого мужчины”. С 1930 года и до конца своей жизни Серебровский — заведующий основанной им кафедрой генетики на биологическом факультете МГУ. Выпускникам кафедры генетики МГУ полезно знать, кто основатель их alma mater. Вам не кажется интересным задуматься, как бы мы жили, если бы планы Александра Сергеевича осуществились? Кто бы рекомендовал сперму нашим дамам?

Но вернемся к Промптову. После окончания в 1923 году биофака МГУ он работал препаратором, а потом научным сотрудником на Звенигородской биостанции. Позже он был активным участником семинаров Тимофеева-Рессовского, и когда последний надолго уехал в Германию, то предложил Промптову с женой поселиться в его московской квартире. Работу по мутагенному действию ультрафиолета на модели дрозофилы Александр Николаевич выполнил в 1931 г. уже в Москве на ул. Обуха, 6 (Воронцово поле), где тогда располагался Институт экспериментальной биологии, руководимый Н.К. Кольцовым. По этой теме в 1931 и 1932 годах опубликовано две статьи, одна из которых в Кембридже. То есть мутагенное действие ультрафиолета было открыто недалеко от Курского вокзала. Таким образом, огромный вклад отечественных ученых в создание и развитие науки “Радиационная генетика” не вызывает сомнений.

Со многими из действующих лиц этого повествования я встречался лично. Джозеф Гринберг посетил Москву в 1967 году, когда я был еще аспирантом. Это был очень мягкий, интеллигентный человек. Его хобби — наблюдение птиц (bird-watcher). Он рассказывал мне, насколько это непростое занятие — нужна мощная оптика, хорошая фотоаппаратура (хотя сам он, кажется, не снимал, а только наблюдал) и автомобиль с мощным движком, который “мог бы забираться на крутой холм на прямой передаче”. После традиционного “Лебединого озера” в Большом театре на вопрос о музыке Чайковского Джозеф ответил: “Очень романтическая музыка”. Мои знания о музыке тогда приближались к нулю, и я спросил:

- А бывает другая?
- Бывает.
- Например?
- Например, Малер.

Пожалуй, это было началом моего музыкального образования. Позже к музыке меня приобщали уже другие люди.

Э. Виткин оказалась в Москве в самом начале 1970-х, кажется, весной. Ни Владимира Дмитриевича Тимакова, ни Аделины Генриховны в стране не было. Принимали сами. Она выступила с кратким обзором последних данных по УФ-индуцированному мутагенезу. Мы организовали чай с десертом. Так как за ее работами мы следили и были, что называется, в курсе дела, то длинных дискуссий не было. Я знал, что вчера у группы Эвелины была экскурсия по Москве-реке на прогулочном теплоходе. Спросил о впечатлениях. В ответ увидел полуприкрытые глаза, улыбку и мурлыканье: “It was beautiful”. “Ну, прямо пантера Багира”, – подумал я. Еще она рассказала мне о том, что причиной отъезда ее родителей из России была революционная активность ее мамы. О каких годах шла речь, я не запомнил.

Фил Хэнзуолт тоже был в Москве в первой половине 1970-х. Он был участником международного биофизического конгресса. Мы с Сашей Саенко разговаривали с ним на скамейке против входа на биофак МГУ. Фил помог нам с английским текстом нашей статьи, которая вскоре была опубликована в журнале *BBRC*. Через несколько лет Фил был у меня в гостях дома в Строгино. Мы пошли гулять в Троице-Лыково, и на берегу реки побросали летающую тарелочку (рис. 6).

“Никто мне не поверит, – сказал Фил, – если я расскажу в Стэнфорде, что в Москве, на реке я играл во фрисби”.

Когда я был в Стэнфорде, Фил занимал достаточно значимую позицию – он был главой отдела биологии Стэнфордского университета. Лаборатории этого отдела тогда возглавляли такие ученые, как Чарльз Яновский и Артур Корнберг. У Фила двое маленьких детей – Лиза и Алекс. Им примерно по 5–6 лет. Номер его автомобиля выглядит так: LIZALEX и никаких цифр – Калифорния, и этим все сказано! Мы едем в этом автомобиле на тренировку супруги Фила – она увлеченно занимается фламенко. Дети возятся на заднем сиденье, у Лизы в руках оказывается печенье, которое Алекс пытается у нее отобрать с возгласами: “Cookies must be shared!”. Сейчас это очень взрослые, серьезные люди. Алекс, кажется, преуспевающий юрист. Мы с Филом беседуем о музыке. Я признаюсь ему, что один из моих самых любимых джазовых композиторов – Дэйв Брубек. Вспоминаем его вещи. Я упоминаю Lake Tahoe. “Я там свой медовый месяц провел”, – говорит Фил.

Супруги Сетлоу посетили нашу лабораторию вдвоем. Дик – человек небольшого роста, изящного телосложения. Джейн – высокая, крупная женщина. Чувствуется, что она в семье главная. Войдя в нашу лабораторную комнату и быстро оглядевшись, она тут же выдает афоризм: “Большая страна – большие чашки”. Имеются в виду



Рис. 6. Ф.С. Хэнзуолт в Троице-Лыково.

Fig.6. P.C. Hanawalt in Troitse-Lytkovo.

чашки Петри. Я замечаю, что ее страна тоже не маленькая. “Да, – говорит Джейн, – но чашки у нас меньше”. Аделина Генриховна задает вопрос о детях. Есть ли и сколько? “Есть”, – отвечает Джейн, после чего следует пауза. Смотрит на мужа. Он пожимает плечами и молчит. Наконец, Джейн отвечает нерешительно: “Кажется, пять”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Witkin E.M.* Genetics of resistance to radiation in *Escherichia coli* // *Genetics*. 1947. V. 32. P. 221–248.
2. *Lederberg J., Tatum E.L.* Gene Recombination in *Escherichia Coli* // *Nature*. 1946. V. 158. № 4016.
3. *Hill R.F.* A radiation-sensitive mutant of *Escherichia coli* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1958. V. 30. P. 636–637.
4. *Philip C. Hanawalt.* The Awakening of DNA Repair at Yale Focus: 50 Years of DNA Repair: The Yale Symposium Reports // *Yale J. Biol. Med.* 2013 Dec. V. 86. № 4. P. 517–523. Publ. online 2013 Dec 13.
5. *Setlow R.B., Carrier W.L.* The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1964. V. 51. P. 226–231.
6. *Boyce R.P., Howard-Flanders P.* Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1964. V. 51. P. 293–300.
7. *Greenberg J.* Loci for radiation sensitivity in *Escherichia coli* Bs-1 // *Genetics*. 1967. V. 55. P. 198–201.
8. *Shineberg B., Zipser D.* The lon gene and degradation of beta-galactosidase nonsense fragments // *J. Bacteriol.* 1973. 01 Dec. V. 116. № 3. P. 1469–1471.
9. *Fredriksson A., Ballesteros M., Dukan S., Nyström T.* Defence against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 4207–4213.

10. Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A. Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli* // *Sci.* 2001. Jul 27. V. 293. № 5530. P. 705–708.
11. Smirnov G.B., Favorskaya Y.N., Skavronskaya A.G. Range of action of the mechanism that repairs damage induced by certain chemical agents in *Escherichia coli* K-12 // *Sov. Genet.* 1973 Sep. V. 7. № 3. P. 366–371.
12. Смирнов Г.Б., Бодоев И.Н., Макарова А.П. и др. Сравнительная геномика штаммов *Escherichia coli* AB1157, AB2463, AB2494 и AB1885 // *Молек. генетика, микробиология и вирусология.* 2019. Т. 37. № 3. С. 134–139. [*Smirnov B., Bodoev I.N., Makarova A.P., et al. Sravnitel'naya genomika shtammov Escherichia coli AB1157, AB2463, AB2494 i AB1885 // Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2019. V. 37. № 3. P. 134–139. (In Russian)]
13. Серебровский А.С. Антропогенетика и евгеника в социалистическом обществе // *Медико-биологический журнал.* 1929. Вып. 5. С. 1–19. [*Serabrovskiy A.S. Antropogenetika i evgenika v sotsialisticheskom obschestve // Mediko-biologicheskij zhurnal.* 1929. Issue 5. P. 1–19. (In Russian)]

At the Dawn of Radiation Genetics

G. B. Smirnov^{a, #}

^a Federal Scientific Clinical Center for Physico-chemical Medicine of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

[#] E-mail: smirnovgb@yandex.ru

Persons, events and experiments related to the first steps in the studies of the mechanisms responsible for bacterial resistance and sensitivity to radiation are discussed.

Keywords: Radiation sensitivity, radiation resistance, UV-light, repair systems, bacteria, genetic control

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ “ЯДЕРНО-ФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ” (К 50-ЛЕТИЮ СО ДНЯ ОБРАЗОВАНИЯ ФГБНУ ВНИИ РАДИОЛОГИИ И АГРОЭКОЛОГИИ)

DOI: 10.31857/S0869803121020120

16–18 сентября 2020 г. в Обнинске в рамках празднования 50-летия со дня образования ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии” состоялась Международная научно-практическая конференция “Ядерно-физические исследования и технологии в сельском хозяйстве”. Проведение конференции поддержано Министерством науки и высшего образования, Российской академией наук, Научным советом РАН по радиобиологии, Ядерным обществом России, Администрацией г. Обнинска, Калужским кластером ядерных технологий и др.

В конференции приняли участие более 200 ученых и специалистов из России, Беларуси, Казахстана, Украины, Узбекистана, Азербайджана, Молдовы.

Среди организаций-участников более 50 научно-исследовательских институтов и центров Российской академии наук и ведущих образовательных учреждений России, Институт молекулярной биологии и биотехнологии и Институт радиационных проблем НАН Азербайджана, Институт почвоведения и агрохимии НАН Республики Беларусь, ГНУ “НИЭИ Минэкономики РБ” (Могилевский региональный центр), МГЭИ им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Институт ядерной физики и Институт радиационной безопасности и экологии РГП НЯЦ Республики Казахстан и др.

Активное участие в работе конференции принимали молодые ученые.

На пленарной сессии и на секционных заседаниях было заслушано 76 устных, представлено 16 стендовых и 34 заочных доклада.

Пленарную сессию открыла директор ФГБНУ ВНИИРАЭ *Н.И. Санжарова* докладом “Всероссийскому научно-исследовательскому институту радиологии и агроэкологии – 50 лет: Время, события, люди”, в котором рассказала об истории создания института, предпосылках и источниках его рождения. При создании ВНИИСХР (первоначальное название) уже на стадии проектирования были определены основные направления де-

ятельности, связанные с решением проблем ведения сельскохозяйственного производства в условиях применения ядерного оружия и действия его поражающих факторов, а также мирного использования ядерных технологий в разных отраслях аграрного комплекса. Разработки института нашли применение при совершенствовании военной доктрины СССР и проведении переговоров по ограничению испытаний ядерного оружия. Значительная роль принадлежит институту при ликвидации последствий аварии на ЧАЭС в сельском хозяйстве: разработаны научные основы ведения агропромышленного производства, внедрены системы защитных и реабилитационных мероприятий в зоне аварии на площади более 1 млн га. Для отдаленного периода после аварии разрабатываются новые подходы к реабилитации загрязненных территорий, которые реализуются на территории Брянской области; усилия ученых направлены на возвращение в хозяйственное пользование сельскохозяйственных земель, выведенных из землепользования. ВНИИРАЭ проводит многолетние исследования по обеспечению экологической безопасности предприятий ядерно-топливного цикла: комплексный мониторинг, оценка последствий штатного функционирования, системы реагирования в АПК в случае аварийных ситуаций. Созданные в институте методы широко используются при оценке экологической ситуации в регионах размещения российских АЭС. В настоящее время во ВНИИРАЭ ведутся работы по широкому спектру вопросов – от изучения молекулярно-клеточных механизмов действия физических и химических факторов до разработки современных технологий и создания пилотных и промышленных установок по применению ядерно-физических факторов при производстве, хранении и переработке сельскохозяйственной продукции.

В выступлении *С.П. Торшина* (ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва) показан значительный вклад Тимирязевской сельскохозяйственной академии, в частности кафедры агрохимии и особенно Биофизической лаборатории (БФЛ), в становление радиоэкологии.

Названы выдающиеся ученые, которые по разным направлениям разрабатывали эту науку. Это — руководители БФЛ Д.Д. Иваненко и В.М. Клечковский, заведующие секторами — А.Г. Шестаков, С.П. Целищев, И.В. Гулякин, А.С. Завельский. Представлены основные направления и результаты научно-исследовательской деятельности БФЛ, отмечено, что именно Биофизическая лаборатория явилась фундаментом для создания Всесоюзного НИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии.

В.А. Бударков (ФГБНУ ФИЦВиМ, п. Вольгинский Владимирской обл.) рассказал о творческих контактах ФИЦ вирусологии и микробиологии и ВНИИ радиологии и агроэкологии, описал общие задачи, стоящие перед двумя учреждениями — решение актуальных проблем защиты агропромышленного производства от факторов радиационной, химической и биологической природы. Особое внимание в докладе было уделено совместным исследованиям на базе уникального научного комплекса с замкнутым циклом технологического оборудования для проведения радиобиологических исследований с неразделенной смесью модельных продуктов ядерного деления, отвечающего самым высоким требованиям в обеспечении безопасности. В докладе обобщены основные направления исследований в области ветеринарной радиобиологии, рассмотрены способы защиты сельскохозяйственных животных от радиационных поражений, а животноводческой продукции от радионуклидных загрязнений.

Заседание *Круглого стола, посвященного 75-летию атомной отрасли и 50-летию ВНИИРАЭ*, началось с доклада *А.В. Панова* и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ) о радиозоологических исследованиях института в районах размещения предприятий ГК «Росатом». Востребованность радиозоологии и ее быстрое развитие связаны с освоением ядерной энергии, в первую очередь, ее военным применением. Повышение естественного радиационного фона в результате глобальных выпадений после ядерных испытаний определило роль радиозоологии как самостоятельной области знаний с четко выделенными прикладными задачами. Среди ключевых проблем можно выделить изучение накопления искусственных радионуклидов в компонентах окружающей среды и радиозоологические последствия для человека и биоты. Разработка и реализация систем радиозоологического мониторинга в регионах размещения радиационно-опасных объектов являются одними из важных направлений деятельности института на разных стадиях функционирования АЭС. На современном этапе при проведении работ широко используются ГИС-технологии для визуализации данных мониторинга, а также базы данных для аккумуляции и систематизации информации. Рассмотрены особенности радиозо-

логических проблем на настоящем этапе и перспективы их решения во ВНИИРАЭ.

С.В. Фесенко (ФГБНУ ВНИИРАЭ) рассказал об участии ВНИИРАЭ в международных проектах по радиационной безопасности предприятий ЯТЦ. Представлена информация о развитии международных контактов ВНИИ радиологии и агроэкологии. До Чернобыльской аварии международное сотрудничество в области радиозоологических исследований носило ограниченный характер и осуществлялось в рамках взаимодействия СССР с Международной комиссией по радиологической защите и Научным Комитетом ООН по действию атомной радиации. Чернобыльская авария инициировала быстрое развитие международного сотрудничества с зарубежными странами, послужила стимулом для организации множества проектов МАГАТЭ, Комиссии Европейского Сообщества. Динамично развивались в это время и двухсторонние контакты с учеными стран, пострадавших от этой аварии. С 2011 г. ВНИИРАЭ оказывает техническую и консультационную поддержку по ликвидации последствий аварии на АЭС Фукусима-1 в области сельскохозяйственной радиологии и реабилитации сельскохозяйственных угодий.

В докладе *О.Н. Полянской* и соавт. (ФГБУ «НПО «Тайфун», г. Обнинск) приводится анализ наблюдений за приземным слоем атмосферы в Центральном федеральном округе (ЦФО) в 2010–2020 гг. на сети радиационного мониторинга Росгидромета.

В докладах сотрудников ФГБНУ ВНИИРАЭ (г. Обнинск) представлены результаты исследований радиационной обстановки в регионах расположения радиационно-опасных объектов. *С.И. Спиридоновым* и соавт. предложены подходы к радиозоологическому обоснованию разрабатываемых объектов ядерного топливного цикла и планированию мониторинга таких объектов, выполнены сравнительные оценки российских и зарубежных реакторных установок с точки зрения радиационного воздействия на биоту при постулируемых авариях. На базе созданной в 2003 г. сети радиационно-экологического мониторинга *В.К. Кузнецов* и соавт. исследовали динамику содержания природных и техногенных радионуклидов в компонентах аграрных экосистем в регионе размещения Курской АЭС. За последние 17 лет эксплуатации Курской АЭС не было зафиксировано достоверного увеличения содержания техногенных радионуклидов в продукции сельского хозяйства, продуктах питания и объектах окружающей среды. Дозы облучения различных возрастных групп городского и сельского населения от техногенных радионуклидов в районе расположения Ленинградской АЭС представлены в докладе *В.Э. Нуштаевой* и соавт. на основе данных радио-

экологического обследования региона. *Д.Н. Курбаков* и соавт. проводили исследование уровней и механизмов загрязнения тритием 10-километрового участка р. Протва, находящегося в зоне потенциального влияния ряда радиационно-опасных объектов: реакторных установок, хранилищ радиоактивных отходов.

М.А. Эдомская и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск, ФГБНУ ВНИИ агрохимии, Москва, РГП ИЯФ РК, г. Алматы, Казахстан) представили результаты исследований уровня глобальных выпадений плутония на территории СНГ методом альфа-спектрометрии с предварительным радиохимическим выделением.

На секции “*Радиоэкология*” были представлены 13 докладов.

О.А. Мерзлова (ГНУ “НИЭИ Минэкономики РБ” (Могилевский региональный центр), г. Могилев, Беларусь) рассказала об основных этапах и мероприятиях реабилитации сельскохозяйственных земель Республики Беларусь, временно выведенных из оборота в результате аварии на ЧАЭС.

В докладе *П.В. Прудникова* (ФГБУ “Брянск-агрохимрадиология”, п. Мичуринский Брянской обл.) представлены результаты исследований содержания и форм нахождения ^{137}Cs в почвах испытательных полигонов в зоне выпадения радиоактивных осадков в результате аварии на Чернобыльской АЭС, и его миграции по почвенному профилю. Показана эффективность воздействия различных минеральных удобрений и мелиорантов на снижение перехода ^{137}Cs в травостой многолетних трав.

С.Н. Лукашенко и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск; ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва; МГЭИ им. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь) проводили совместные исследования концентрации трития в различных компонентах экосистемы, включающей лесную и луговую компоненту в пойме р. Протва. Источником трития на изучаемой территории являются подземные воды, загрязненные в результате разгерметизации рядом расположенного (до 1 км) старого хранилища радиоактивных отходов.

Специфика пространственного перераспределения техногенных радионуклидов ^{90}Sr и ^{137}Cs на тестовых участках, расположенных в головной части Восточно-Уральского радиоактивного следа и характеризующих лесные ненарушенные и луговые ЭЛГС, рекультивированные после аварии 1957 г., была рассмотрена в докладе *Е.М. Коробовой* и соавт. (ГЕОХИ РАН, г. Москва; ФГУП “ПО “МАЯК”, г. Озерск; УП “Геоинформационные системы”, г. Минск, Беларусь; ИЭРиЖ УрО РАН, г. Екатеринбург; НИЦ “Курчатовский институт”, г. Москва).

А.Н. Раздайков и соавт. (ВНИИЛМ, г. Пушкино) исследовали возможность применения данных дистанционного зондирования для оценки радиоактивного загрязнения после аварии на ЧАЭС природных территорий Брянской области, на примере сосновых лесов хвойно-широколиственной лесорастительной зоны. *В.В. Калниным* и соавт. (ФБУ ВНИИЛМ, г. Пушкино) изучены закономерности распределения ^{137}Cs в коре сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

О.Л. Комиссарова и соавт. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) проводили сравнительный анализ распределения цезия-137 и калия в системе “почва–ризосфера–растение” в агроценозе пшеницы на радиоактивно загрязненной территории Плавского пятна Тульской области. *О.Б. Цветнова* и соавт. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) рассказали об особенностях накопления ^{137}Cs в травянистой растительности и грибах в сосново-березовом насаждении Брянского Полесья в отдаленный период после чернобыльских выпадений.

М.А. Басовой и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск) приведены расчеты дозовых коэффициентов конверсии при поступлении с кормом радиоактивных изотопов йода в организм крупного рогатого скота путем моделирования щитовидной железы (ЩЖ) при помощи программы транспорта излучений MCNP.

М.М. Годяева и соавт. (ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, г. Москва; МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ГЕОХИ РАН, г. Москва) в условиях гидропонного модельного опыта с луком репчатый (*Allium cepa*) изучали влияние ^{137}Cs на его внешние признаки и биомассу, а также переход и распределение ^{243}Am в растениях лука. В докладе *Т.М. Середина* и соавт. (ФГБНУ ФНЦО, пос. ВНИИСОК Московской обл.; ФГБНУ ФИЦ ВНИИГР им. Н.И. Вавилова) дано описание коллекционного питомника лука батуна по накоплению в листьях радионуклидов в условиях Нечерноземья. Как показали результаты исследований, по уровню накопления радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr проявляются сортовые различия и специфика накопления обоих элементов.

На секции “*Ядерно-физические технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности*” было заслушано 16 выступлений.

М.Н. Аванесов (АО “Русатом Хэлскеа”, г. Москва) представил план мероприятий по изучению возможности применения ионизирующего облучения для обработки сельскохозяйственной, пищевой продукции и внесения изменений в нормативно-правовую базу Евразийского экономического союза в сфере агропромышленного комплекса.

А.А. Исемберлинова и соавт. (ТПУ, г. Томск) исследовали возможность использования им-

пульсного электронного пучка для снижения зараженности фитопатогенными грибами *P. Penicillium* семян пшеницы. Установлен наиболее эффективный режим обработки, при котором происходит снижение зараженности грибами *P. Penicillium* spp. семян пшеницы с сохранением всхожести зерен.

Ю.А. Дорн и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск) получены экспериментальные данные для построения калибровочной кривой дозиметрических радиохромных пленок марки Gafchromic HD-V2 в диапазоне доз от 20 до 150 Гр с целью дальнейшего их применения для контроля поглощенной дозы при радиационной обработке сельскохозяйственной и пищевой продукции. Получена формула расчета поглощенной дозы фотонного излучения в зависимости от изменения оптической плотности пленки.

В докладе А.А. Брызгина и соавт. (ИЯФ СО РАН, г. Новосибирск) представлены мощные импульсные линейные ускорители электронов ИЛУ и их применение в пищевой промышленности.

Р.А. Вазиров и соавт. (ФГАОУ ВО УрФУ, г. Екатеринбург) исследовали дозиметрические характеристики низкоэнергетического электронного пучка (НЭП), генерируемого ускорителями УРТ-0.5 и УРТ-1, для применения радиационной обработки пищевой продукции. Пищевая ценность и свойства продукции, обработанной таким методом, меньше подвержены негативному влиянию радиационной обработки, чем при облучении высокоэнергетическим электронным излучением, обрабатывающим весь объем продукции.

Р.С. Чурюкин (ООО “Теклеор”, Калужская обл.) рассказал об опыте развития технологии антимикробной обработки продуктов питания ускоренными электронами первого в России Центра разработки и внедрения “Теклеор-Калуга”. В.А. Леонтьевым и соавт. (МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва; СФНЦА РАН, пос. Краснообск Новосибирской обл.; НИИЯФ МГУ, г. Москва) проведены исследования по радиационной обработке ускоренными электронами с энергией 1 МэВ фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani Kuhn*, выращенного из склероциев, облученных в диапазоне доз от 20 до 38 000 Гр.

В ряде докладов сотрудников ФГБНУ ВНИИРАЭ представлены результаты экспериментов по применению радиационных технологий в сельском хозяйстве и пищевом производстве: влияние γ -излучения на содержание редуцирующих сахаров в клубнях картофеля (Т.В. Чиж и соавт.); оценка влияния разных видов ионизирующих излучений на жизнеспособность зернового точильщика и влияния электронного облучения семян зерновых культур на их устойчивость к поражению корневой гнилью (Н.Н. Лой и соавт.); особенности применения радиационных технологий

для обеспечения микробиологической безопасности и качества полуфабрикатов и продуктов, готовых к употреблению (В.О. Кобялко и соавт.; В.Я. Саруханов и соавт.); изменение качественного и количественного состава микроорганизмов в облученных и необработанных ионизирующим излучением рыбных пресервах в процессе хранения (И.В. Полякова и соавт.).

М.Г. Помясова и соавт. (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск) изучали возможность применения нетермальной плазмы для обработки семян ярового ячменя для устранения зараженности грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

В докладах А.С. Березина и соавт. (ВНИИФБиП, г. Боровск) рассматривались приемы обработки белковых кормов для повышения усвояемости их протеина в желудочно-кишечном тракте жвачных животных, а также использование тепловой обработки для снижения распадаемости протеина кормов в рубце коров.

Секция “Радиационная биология” представлена 16 докладами.

В.А. Бударков (ФГБНУ ФИЦВиМ, п. Вольгинский Владимирской обл.) отметил роль ФГБНУ ФИЦВиМ в развитии ветеринарной радиобиологии в Российской Федерации. В докладе были обобщены основные направления исследований в области ветеринарной радиобиологии: изучение биологических и генетических свойств микроорганизмов, вопросов иммунологии и эпизоотологии, способов защиты сельскохозяйственных животных от радиационных поражений, а животноводческой продукции от радионуклидных загрязнений. Т.Р. Гайнутдиновым и соавт. (ФГБНУ ФЦТРБ—ВНИВИ, г. Казань) проведены исследования по определению радиорезистентности возбудителя колибактериоза сельскохозяйственных животных.

Несколько докладов были представлены учеными ВНИИФБиП (г. Боровск Калужской обл.). К.Т. Еримбетов и соавт., проводили исследование метаболизма белков мышц *in vitro* и *in vivo*. Езерским В.А. и соавт. изложен краткий обзор успешных экспериментов в мировой практике по редактированию гена беталактоглобулина у крупного и мелкого рогатого скота с использованием методов геномного редактирования, а также приведены результаты собственных исследований. В докладе Е.М. Колосковой и соавт. обсуждалась возможность применения рекомбинантного лактоферрина, выделенного из молока трансгенных домашних животных, для лечения лучевой болезни, а также в лечении и профилактике Covid-19.

Я.А. Ольховским и соавт. (НПЦ “Липосомальные Технологии”, г. Елабуга) рассмотрены вопросы уменьшения накопления радионуклидов в организме человека и их выведение, лечение от удаленных последствий радиационных пораже-

ний, посредством использования липосомальных форм биологически активного йода. В исследованиях *К.С. Остренко* и соавт. (МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь; ВНИИФБиП, г. Боровск Калужской обл.) получены данные о выраженных радиосенсибилизирующих свойствах соли оксиглицина лития.

М.А. Гринберг и соавт. (ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород) изучали влияние хронического β -облучения на электрические сигналы растений. *Ю.П. Чукова* (Краснопресненский региональный фонд охраны природы и здоровья населения, г. Москва) выступила с докладом “Радиационный гормезис: физический смысл и значимость для естествознания”.

В докладе *С.А. Гераськина* (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск) рассмотрены закономерности и механизмы формирования экологических эффектов облучения. Первые радиационные эффекты в экосистемах зависят от радиочувствительности составляющих их видов и могут меняться в зависимости от дозы — от слабого ингибирования до гибели организмов и даже до разрушения экосистемы. Различия в радиочувствительности составляющих экосистему организмов создают предпосылки для формирования вторичных радиационных эффектов, которые связаны с рассогласованием функциональных связей в биоценозе: происходит угнетение радиочувствительных и интенсивное развитие радиоустойчивых видов; нарушение трофических связей из-за гибели входящих в эти цепочки видов; большое количество органических остатков ведет к массовому размножению насекомых-вредителей. Автором приведены примеры воздействия острого и хронического облучения, которые показывают, что биологическое разнообразие является более чувствительным показателем, чем биомасса. Сложные взаимоотношения между составляющими экосистему и различающимися радиочувствительностью организмами ведут к последствиям, которые невозможно предсказать, базируясь только на информации об эффектах радиационного воздействия на организмном уровне, и корректная оценка последствий радиационного воздействия невозможна без учета базовых экологических принципов.

Учеными ФГБНУ ВНИИРАЭ (г. Обнинск) были представлены еще несколько докладов по радиобиологии растений. В исследованиях *П.Ю. Волковой* и соавт. изучен широкий диапазон физиологических и биохимических показателей в популяциях хронически облучаемых травянистых растений из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС, принадлежащих к семействам, характеризующимся разной чувствительностью к острому облучению. Выявлены изменения ряда параметров фотосинтеза в результате хронического облучения. В работе *С.В. Битаршвили* и

соавт. исследован фитогормональный статус красной японской сосны с нарушениями апикального доминирования, произрастающей на территории, загрязненной радионуклидами в результате аварии на АЭС Фукусима. *О.А. Гусева* и соавт. проводили экспериментальные исследования влияния острого УФ (А + В) облучения разными дозами на фотосинтетический аппарат ячменя и последующую урожайность. Выявлена прямая зависимость снижения урожайности от дозы облучения. *Е.В. Бондаренко* и соавт. проводили исследования зависимости параметров прорастания семян *Arabidopsis thaliana* с нарушениями синтеза или рецепции абсцизовой кислоты от дозы гамма-излучения.

В.В. Калниным и соавт. (ФБУ ВНИИЛМ, г. Пушкино, ФГБУН ИОГ им. Н.И. Вавилова РАН, Москва) представлены результаты биоиндикационной оценки нарушений стабильности развития березы повислой в условиях радиоактивного загрязнения. Авторами предложен новый метод оценки нарушений стабильности развития древесных растений с использованием коэффициента диссимметрии листовой пластинки.

Секция **Агроэкология** была представлена 8 докладами.

На заседании секции рассматривались вопросы загрязнения снежного покрова в 30-км зонах воздействия ООО “НЛМК-Калуга” и ПАО “НЛМК-Липецк” (*Д.Н. Курбаков* и соавт., ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск); изучение тяжелых металлов в стоке при дождевании (*А.В. Прущик*, ФГБНУ “Курский ФАНЦ”, г. Курск); исследование информативности биохимических маркеров устойчивости ярового ячменя к действию кадмия в условиях лабораторного и вегетационного экспериментов (*А.В. Дикарев*, ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск); влияние органо-минерального комплекса Геотон и микробных препаратов на биологическую активность при возделывании ярового ячменя (*Hordeum Vulgare L.*) (*Суслов А.А.* и соавт., ФГБНУ ВНИИРАЭ).

В.О. Лемешевский (МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, г. Минск) рассказал об экологических подходах к получению продукции выращивания бычков с использованием рапса сорта “Явар”. *Э.Б. Мирзоев* (ФГБНУ ВНИИРАЭ, г. Обнинск) отметил, что установленные в Российской Федерации максимально допустимые уровни (МДУ) свинца в кормах для крупного и мелкого рогатого скота не позволяют получить продукты питания (мясо, молоко), соответствующие международным нормативам. Для обеспечения продовольственной безопасности населения РФ (молоко, мясо, субпродукты) на основе санитарно-гигиенических нормативов ВОЗ необходимо в токсикологических исследованиях верифицировать допустимые пределы суточного поступления

свинца с рационом и уточнить МДУ в кормах для сельскохозяйственных животных. В докладах ученых ВНИИФБиП (г. Боровск, Калужской обл.) были рассмотрены комбикорма с разными уровнями протеина и аминокислот в питании свиней как способ снижения загрязнения окружающей среды азотом (*Н.С.-А. Ниязов* и соавт.), и показана роль пероксисомальных и митохондриальных процессов в защите организма животного от неблагоприятных факторов окружающей среды (*В.П. Галочкина* и соавт.).

Закончилась конференция принятием решения, в котором отмечен огромный вклад ВНИИРАЭ в решение крупных государственных задач, направленных на оценку возможных последствий глобального ядерного конфликта и обеспечения устойчивости АПК в условиях технологически безопасного развития ядерной энергетики, снижение последствий для сельского хозяйства и населения от ядерных катастроф, развитие АПК в условиях техногенеза. За время работы ВНИИРАЭ превратился в крупный центр международной науки в области радиоэкологии, агроэкологии и радиобиологии, активно сотрудничающий с МАГАТЭ, ФАО, МКРЗ, НКДАР ООН и другими авторитетными международными организациями.

Несмотря на очевидные достижения российской науки в научной поддержке устойчивого развития АПК РФ в условиях нарастающего техногенного воздействия, эта проблема все еще остается чрезвычайно актуальной. Отмечается существенное отставание в развитии и использовании высокоэффективных радиационных технологий, направленных на снижение потерь сельскохозяйственной продукции и на ее безопасность, крайне необходимо совершенствование законодательно-нормативной базы на их внедрение. Развитие и применение технологий с использованием ядерно-физических методов может стать одним из важнейших как для приоритетного развития высокопродуктивного и технологически чистого сельского хозяйства, так и в достижении результатов обеспечения качества пищевой продукции. Требуют совершенствова-

ния методы, средства и нормативная база мониторинга окружающей среды в районах расположения радиационно-опасных и других производств, оказывающих воздействие на ведение агропромышленного производства и качество сельскохозяйственной продукции. При этом особое внимание должно уделяться обоснованию нормирования техногенных факторов, определяющих эти воздействия. Необходимо продолжать развитие методов и технологий безопасного ведения сельскохозяйственного производства в районах с повышенным техногенным фоном. Важно и дальше развивать радиобиологические и радиоэкологические исследования, направленные на оценку последствий радиационного загрязнения окружающей среды, изучение фундаментальных механизмов действия радиации на живые организмы и оптимизации радиационных технологий, применяемых для обеспечения качества продукции.

Конференция считает необходимым: обратиться к руководству Российской академии наук, Министерства образования и науки Российской Федерации с просьбой о расширении содержания фундаментальных и прикладных исследований, связанных с обеспечением безопасного ведения агропромышленного производства в условиях техногенеза, включая применение ядерно-физических факторов для обеспечения продовольственной безопасности страны; заинтересованным организациям и ведомствам рассмотреть вопрос объединения в ассоциацию “Ионизирующее излучение в биотехнологии” с целью координации усилий по разработке новых технологий и создания соответствующей нормативно-правовой базы.

Опубликован сборник докладов “Ядерно-физические исследования и технологии в сельском хозяйстве” (Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2020. 383 с.: ил.).

*С.И. Санжарова**, *О.Э. Пронина*,
ФГБНУ “Всероссийский
научно-исследовательский институт
радиологии и агроэкологии”, Обнинск

К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ФЁДОРА АНАТОЛЬЕВИЧА ТИХОМИРОВА (1931–2003)

DOI: 10.31857/S0869803121020119



Фёдор Анатольевич Тихомиров родился 1 января 1931 г. в д. Карповское Харовского района Вологодской области. В 1954 г. он окончил Ленинградский политехнический институт, а в 1957 г. – аспирантуру Физического института им. П.Н. Лебедева АН СССР. В 1964 г. защитил кандидатскую диссертацию “Радиоактивное загрязнение и лучевое поражение леса”. В 1957–1959 гг. Ф.А. Тихомиров работал на Физическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, а с 1959 по 1969 г. – в Институте прикладной геофизики Главного управления гидрометеорологической службы СССР.

В 1969 г. Ф.А. Тихомиров возглавил Лабораторию радиобиологии Биолого-почвенного факультета МГУ. В 1973 г. по его инициативе лаборатория, вошедшая в состав вновь образованного в МГУ факультета Почвоведения, была преобразована в лабораторию радиоэкологии, где он беспрерывно трудился до последних дней. Этот период характеризуется интенсивными исследованиями поведения в системах “почва–растения” наиболее значимых в биологическом отношении радионуклидов.

В 1974 г. Ф.А. Тихомиров защитил диссертацию “Радиоэкология лесного биогеоценоза” и ему была присвоена ученая степень доктора биологических наук, а позднее – ученое звание профессора по специальности “Экология”.

В течение более 25 лет, начиная с 1959 г., научная деятельность Ф.А. Тихомирова была связана с радиоэкологическими исследованиями на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа на базе Опытной научно-исследовательской станции – *Alma mater* отечественной радиоэкологии. Здесь Ф.А. Тихомиров под руководством своих учителей проф. Г.Ф. Хильми и чл.-корр. АН СССР А.А. Молчанова выполнил уникальные комплексные исследования воздействия ионизирующих излучений на лесные экосистемы и миграции радионуклидов в лесных биогеоценозах. Особое внимание он уделил радиобиологии и радиоэкологии хвойных древесных растений, радиочувствительность которых близка к радиочувствительности млекопитающих. Результаты именно этих исследований позволили ему сформулировать важнейшие положения по радиоэкологии наземных экосистем. Им впервые в мире была рассчитана летальная доза для взрослых деревьев сосны.

С 1986 г. основные работы Ф.А. Тихомирова были связаны с исследованиями последствий аварии на Чернобыльской АЭС и их ликвидацией на территории Украины (в 30-километровой зоне отселения) и Российской Федерации (в Брянской, Калужской и Тульской областях). Итоги исследований Ф.А. Тихомирова в “дочернобыльский” период оказались важными при обосновании и разработке мер по ликвидации экологических последствий этой аварии. Для лесных экосистем различных почвенно-климатических зон были установлены основные пространственно-временные закономерности распределения и биологической доступности радионуклидов в зависимости от форм выпадений и ландшафтных условий, определены биологические индикаторы радиоактивного загрязнения. Результаты исследований Ф.А. Тихомирова послужили экспериментальной и теоретической основой для разработки рекомендаций по ведению лесного хозяйства в зонах загрязнения и реабилитации подобных терри-

торий, а также для создания сети долгосрочного радиоэкологического мониторинга.

Ф.А. Тихомиров разработал и экспериментально обосновал основополагающие концепции современной теоретической и прикладной радиоэкологии, базирующиеся на выводах о специфичности биогеохимических циклов техногенных радионуклидов в природных экосистемах по сравнению с их химическими аналогами, о первичных и вторичных экологических нарушениях в экосистемах при воздействии ионизирующего излучения. Ф.А. Тихомиров также установил биогеохимические барьерные функции лесных экосистем и предложил экологическую экспертизу площадок при проектировании предприятий атомной энергетики, основанную на выявлении и приоритетном рассмотрении “критических” звеньев природных экосистем. Экспериментальным фундаментом этих концепций послужили результаты исследований, проводившихся Ф.А. Тихомировым в зонах радиоактивного загрязнения Уральской и Чернобыльской радиационных аварий. На основе этих исследований в мае 1986 г. им был дан полностью подтвердившийся позднее прогноз радиоэкологических последствий загрязнения лесов в зоне Чернобыльской аварии и была разработана Всесоюзная комплексная программа исследований по лесной радиоэкологии.

С 1991 по 1995 г. в рамках межправительственных соглашений между странами СНГ и ЕС осуществлялся широкомасштабный совместный экспериментальный проект “Поведение радионуклидов в природных и полуприродных экосистемах” (Experimental collaboration No 5. ECP-5 “Behavior of radionuclides in natural and semi-natural environments”), который проводился в рамках международного сотрудничества по проблемам последствий Чернобыльской аварии. Как признанный лидер в лесной радиоэкологии не только в нашей стране, но и за рубежом, Ф.А. Тихомиров был назначен координатором от стран СНГ. В список основных задач проекта в разделе, посвященном вопросам лесной радиоэкологии, входили следующие вопросы:

Поведение радионуклидов в лесных почвах:

- определение роли процессов разложения подстилки в миграции радионуклидов в лесных почвах;
- определение параметров, описывающих вертикальную миграцию радионуклидов в различных слоях почвы;
- определение интенсивности водной миграции радиоцезия в почве;
- определение распределения радионуклидов между компонентами почвенного раствора;
- влияние физико-химических характеристик лесных почв на механизмы сорбции/десорбции цезия.

Определение потоков радиоцезия в системе “почва–растения”:

- оценка распределения радионуклидов между компонентами лесной растительности;
- определение влияния возраста деревьев на содержание радионуклидов в растительности древесного яруса;
- оценка влияния почвенных параметров на переход радионуклидов из почвы в различные виды древесной и травянистой растительности нижнего яруса;
- определение годовых потоков перемещения радионуклидов из кроны деревьев в лесную подстилку;
- определение параметров, влияющих на переход радионуклидов в грибы.

Моделирование:

- разработка математических моделей для описания долговременной динамики загрязнения компонентов растительного покрова и почв лесных экосистем.

Все этапы проекта (от полевых работ до анализа результатов) выполнялись совместно учеными ЕС и СНГ. В конце каждого года работы проводились совещания в странах СНГ или ЕС для сравнения достигнутых результатов и совместного обсуждения развития проекта.

При проведении полевых исследований в лесных экосистемах использовались как оригинальные методики, разработанные и апробированные сотрудниками лаборатории радиоэкологии факультета почвоведения МГУ в ходе комплексных изысканий по оценке экологических последствий аварии в лесных экосистемах, проводившихся с 1986 по 1990 г., так и методики, предложенные нашими зарубежными коллегами.

Для решения поставленных задач дополнительно к уже имеющимся участкам, на которых проводились исследования, была заложена серия пробных площадей. На место реализации работ было завезено современное оборудование, закупленное в рамках проекта.

При сохранении преемственности многолетних исследований проект позволил расширить и модернизировать программу научно-исследовательских работ. В результате были дополнены данные по динамике содержания радионуклидов в компонентах древесного и травянистого ярусов растительного покрова, грибах, лесохозяйственной продукции, их миграции в почве, системе “почва–растение”, биогеохимических циклах в ландшафтах в целом. Удалось провести сравнительный анализ некоторых данных, полученных в 30-километровой зоне отселения Украины, в Ирландии и Германии.

В рамках проекта были разработаны математические модели поведения радиоцезия в лесных

экосистемах, которые позволили дать предварительный прогноз дальнейшего развития ситуации.

Важными итогами выполнения проекта ЕСР-5 являются совместная выработка и согласование научных основ радиоэкологического мониторинга на территориях, покрытых лесом. Результаты, полученные в ходе реализации проекта, в совокупности с ранее полученными данными позволили предложить ряд контрмер, направленных на снижение поступления радионуклидов в лесохозяйственную продукцию и на снижение дозовых нагрузок на население.

С 1998 по 2001 г. под патронажем Европейской Комиссии проводился международный проект “Разработка стратегий восстановления территорий, загрязненных в результате Чернобыльской аварии” (“Input to remediation strategies for the restoration of contaminated territories resulting from the Chernobyl accident”).

Ф.А. Тихомиров курировал раздел, посвященный загрязнению лесных экосистем. В рамках этого раздела проекта была проведена большая аналитическая работа по оценке масштаба и степени загрязнения лесов стран СНГ в результате обширного выпадения радиоактивных осадков при аварии на ЧАЭС в 1986 г. и сопоставлению полученной информации с результатами исследований предыдущих радиационных аварий. В ходе реализации проекта были собраны, обобщены и представлены в виде таблиц и графиков данные по радиоактивному загрязнению компонентов лесных экосистем, лесохозяйственной продукции и дозовым нагрузкам на работников лесного хозяйства. Были обобщены основные закономерности поведения радиоцезия в основных компонентах лесных экосистем: почве, древесном и травянистом ярусах, грибах и лесных ягодах. Был разработан долгосрочный прогноз развития радиологической ситуации на загрязненной территории, покрытой лесами, дана оценка социальных и психологических проблем, возник-

ших в результате создавшейся ситуации. На основании проведенных исследований была предложена система научно обоснованных контрмер по снижению возможного ущерба в результате аварии на ЧАЭС.

Фёдор Анатольевич Тихомиров вел активную научно-общественную и педагогическую работу. Он был руководителем и членом ряда диссертационных советов. Им был разработан курс “Радиоизотопы в почвоведении”, который он читал студентам на протяжении многих лет. Ф.А. Тихомиров опубликовал более 400 работ, в том числе учебное пособие “Радиоизотопы в почвоведении” (1985), учебник для университетов “Почвоведение” (с соавт., 1988), монографии “Действие ионизирующих излучений на биосферу (1967), “Действие ионизирующих излучений на экологические системы” (1972), “Радиоэкология иода” (1983), “Иод-129 в окружающей среде” (с соавт., 1987), “Действие ионизирующей радиации на биогеоценоз” (с соавт., 1988), “Крупные радиационные аварии: последствия и защитные меры” (с соавт., 2001).

Трудно переоценить научный и практический вклад Ф.А. Тихомирова в отечественную и мировую радиоэкологию. Его идеи, разработанные им подходы к решению радиоэкологических проблем и научные труды востребованы по настоящее время. Ф.А. Тихомировым была создана отечественная научная школа в области лесной радиоэкологии. Он подготовил 13 кандидатов наук и двух докторов наук. Его ученики и последователи и по сей день успешно развивают ключевые разделы этого направления. Ими на базе Лаборатории радиоэкологии в 2006 г. была создана и успешно работает Кафедра радиоэкологии и экотоксикологии факультета Почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, на которой поддерживаются традиции научной школы лесной радиоэкологии Ф.А. Тихомирова.

С. В. Мамихин, А. И. Щеглов

Потери науки: Чернов Юрий Николаевич (5 ноября 1937 г. – 1 января 2021 г.)

DOI: 10.31857/S0869803121020077



1 января 2021 г. ушел из жизни профессор Чернов Юрий Николаевич, доктор медицинских наук, заслуженный врач РФ, академик Международной академии человека в аэрокосмических системах, известный специалист в области авиакосмической радиобиологии и клинической фармакологии, почетный профессор Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко.

Юрий Николаевич Чернов родился 5 ноября 1937 г. в Воронеже. С 1955 по 1961 г. — студент Воронежского государственного медицинского института (ВГМИ), после окончания которого работал на врачебных должностях в системе здравоохранения Липецкой области. В 1964 г. принят в аспирантуру при кафедре фармакологии ВГМИ. С 1971 г. — ассистент, старший преподаватель, а затем доцент кафедры фармакологии. В 1987 г.

создал и возглавил кафедру клинической фармакологии, которой заведовал до 2011 г. Одновременно возглавлял деканат лечебного факультета (1992–2006 гг.). До конца жизни — профессор кафедры клинической фармакологии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко.

В 1971 г. Ю.Н. Чернов защитил кандидатскую диссертацию, докторскую диссертацию защитил в 1991 г. в Государственном научно-исследовательском испытательном институте авиационной и космической медицины МО СССР. Тематику его оригинальных исследований были изучение биохимических сдвигов в головном мозге на фоне функциональных и поведенческих проявлений лучевого поражения ЦНС и разработка оригинальных средств фармакологической коррекции данных нарушений, в том числе, из ряда природных соединений продуктов пчеловодства; выявлены критические звенья патогенеза в развитии церебрального синдрома и проявления адаптивных реакций в тканях головного мозга животных в ранние сроки после облучения в сверхсмертельных дозах ионизирующей радиации.

Являясь клиническим фармакологом высшей врачебной квалификации, Ю.Н. Чернов большое внимание уделял разработке комплексной оценки здоровья лиц операторских профессий для обеспечения высокого уровня работоспособности и продления профессионального долголетия, включая летчиков и операторов сложной техники, а также способам эффективного и безопасно назначения им лекарственных средств.

Профессор Ю.Н. Чернов — автор 520 научных публикаций, в том числе пяти учебников по клинической фармакологии, 27 учебных пособий, шести монографий, двух глав национального руководства по клинической фармакологии (2009), практического руководства по клинической авиационной медицине (2011), 42 патентов и пяти программ ЭВМ. Под его руководством подготовлены и защищены 32 кандидатские и четыре докторские диссертации. Активно поддерживал научные контакты с институтом клинической фармакологии клиники Шарите (Германия), где была выполнена под его руководством кандидатская диссертация “Генотипизирование фермен-

тов лекарственного метаболизма”, успешно защищенная в 2003 г. в Берлине.

Юрий Николаевич имел звание “Отличник здравоохранения”, награжден орденом Дружбы народов (2014), медалью ордена “За заслуги перед Отечеством” II степени, медалями Г.К. Жукова, Ю.А. Гагарина, “Ветеран труда”, “Ветеран ВВС”, знаком отличия “За заслуги перед Воронежской областью”. Являлся лауреатом форума “Золотой фонд Воронежской области”, членом-корреспондентом РАЕН, почетным доктором Государственного научно-исследовательского испытательного

института военной медицины Министерства обороны России.

Высокий профессионализм, мудрость и добросердечное отношение профессора Юрия Николаевича Чернова всегда будут в памяти научной общественности, а также его многочисленных учеников и коллег.

*Профессор И. Э. Есауленко,
профессор М. В. Васин,
академик РАН И. Б. Ушаков*