

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Государственный научный центр Российской Федерации –  
Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»

*На правах рукописи*

Роднева Софья Михайловна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА ФОКУСОВ БЕЛКОВ  
РЕПАРАЦИИ ДНК В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ  
ПОСТУПЛЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ТРИТИЯ С НИЗКОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ

Специальность 1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук, профессор РАН  
Осипов Андреян Николаевич

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 Распад трития и клеточные эффекты .....	14
1.2 Экспериментальные исследования на клетках <i>in vitro</i> .....	17
1.2.1 Выживаемость и пролиферация .....	18
1.2.2 Мутагенные эффекты .....	20
1.2.3 Хромосомные аберрации и индукция микроядер .....	20
1.2.4 Оценка фокусов белков репарации ДНК .....	23
1.3 Экспериментальные исследования воздействия трития <i>in vivo</i> .....	24
1.3.1 Основные результаты исследований до 2010 года .....	24
1.3.2 Современные исследования воздействия трития .....	26
1.3.3 Биокинетика и метаболизм трития в организме .....	29
1.4 Заключение к обзору литературы .....	31
ГЛАВА 2. ДОЗИМЕТРИЯ СОЕДИНЕНИЙ С ТРИТИЕМ .....	34
2.1 Методы расчета дозы от излучения трития .....	35
2.2 Методика дозиметрии трития на клеточном уровне .....	40
2.2.1 Метод расчета S-значений электронов низкой энергии .....	40
2.2.2 Геометрический фактор .....	41
2.2.3 Определение диапазона пробега электрона низкой энергии .....	42
2.2.4 Расчет S-значений низкоэнергетических электронов и трития .....	44
2.2.5 Особенности влияния расстояния от ядра и геометрии клетки .....	49
2.3 Активность трития на клеточном уровне .....	51
2.3.1 Распределение молекулярных соединений с тритием в клетках .....	51
2.3.2 Оценка количества распадов трития в ядрах и клетках <i>in vitro</i> .....	52
2.3.3 Кинетика и метаболизм соединений с тритием в организме .....	57
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ .....	62
3.1 Эксперименты <i>in vitro</i> .....	62

3.1.1 Общая схема экспериментов.....	62
3.1.2 Культуры клеток в экспериментах .....	63
3.1.3 Инкубация с соединениями трития .....	64
3.1.4 Иммуноцитохимическое окрашивание.....	64
3.1.5 Измерение удельной радиоактивности в клетках, ядрах и ДНК.....	67
3.1.6 Статистический анализ.....	67
3.2 Эксперименты <i>in vivo</i> .....	67
3.2.1 Экспериментальные животные и соединения трития .....	67
3.2.2 Оценка повреждений ДНК по фокусам $\gamma$ H2AX в спленоцитах .....	68
3.2.3 Оценка количества микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга.....	69
3.2.4 Статистический анализ.....	69
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	70
4.1 Результаты радиобиологических экспериментов <i>in vitro</i> .....	70
4.1.1 Измерение радиоактивности в клетках.....	70
4.1.2 Клетки МСК и MRC-5 человека .....	71
4.1.3 Оценка поглощенной дозы радиации в ядрах МСК костного мозга .....	73
4.1.4 Анализ количества фокусов $\gamma$ H2AX, 53BP1, pATM в ядрах МСК костного мозга, инкубированных с $^3$ H-тимидином и НТО .....	75
4.1.5 Анализ количества фокусов $\gamma$ H2AX, в ядрах фибробластов легкого человека (MRC-5), инкубированных с $^3$ H-тимидином и $^3$ H-аминокислотами.....	83
4.1.6 Сравнительный анализ эффектов в ядрах клеток в зависимости от молекулярного состава хроматина .....	87
4.2 Результаты радиобиологических экспериментов на крысах <i>in vivo</i> .....	90
4.2.1 Оценка радиоактивности в тканях органов крыс при пероральном приеме растворов с $^3$ H-тимидином и НТО.....	90
4.2.2 Анализ количества фокусов $\gamma$ H2AX в ядрах спленоцитов селезенки крыс при пероральном приеме растворов с $^3$ H-тимидином и НТО .....	93
4.2.3 Цитогенетический эффект соединений трития у крыс при пероральном приеме растворов с $^3$ H-тимидином и НТО .....	95

4.3 Обсуждение результатов исследований с тритием .....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	104
ВЫВОДЫ .....	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	109
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	126
БЛАГОДАРНОСТИ .....	127

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы исследования*

Тритий – изотоп водорода, природного и техногенного происхождения. Этот радионуклид является бета-излучателем низкой энергии (средняя энергия 5,7 кэВ) с периодом радиоактивного распада 12,3 года. Естественным образом тритий образуется в высоких слоях атмосферы под действием космических частиц. В нижних слоях атмосферы тритий переходит в молекулы воды и образует меченую тритием воду. Техногенный тритий выбрасывается в окружающую среду ядерными установками (атомными электростанциями, заводами по переработке топлива) и, в большей степени, в результате проведения ядерных испытаний. Ожидается, что будущие технологии термоядерного синтеза тоже должны привести к значительному росту поступления трития в окружающую среду.

Круговорот трития в окружающей среде связан с круговоротом воды, круговоротом органических веществ во время таких процессов, как фотосинтез или биосинтез молекул, из которых состоят клетки у животных. В живых организмах тритий присутствует либо в форме тканевой и межтканевой воды, либо в форме органически связанных трития в белках, нуклеиновых кислотах, липидах и сахараах. Поведение трития в связанной форме в окружающей среде отчасти зависит от природы преобладающих в организмах тритиевых органических молекул.

Технически очень сложно отделить тритиевую воду от обычной воды, так как вода, содержащая тритий, по химическим свойствам практически идентична воде с обычным водородом. Существующие технологии позволяют удалять почти все радионуклиды из загрязненной воды, но неприменимы для дезактивации воды с низкой концентрацией трития в большом объеме.

Тритий может представлять опасность для здоровья, если попадает в организм с питьевой водой или пищей, а также при вдыхании или попадании через кожу в больших количествах. Эксперименты показывают, что

потенциальная токсичность трития может зависеть от его клеточной локализации и удержания в организме [1].

Существует неопределенность, связанная с потенциальным воздействием трития на здоровье. Измеренные экспериментально для трития значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) имеют широкий диапазон от 0,4 до 8 [2]. Основным неоднозначным результатом исследований является количественная оценка и понимание механизмов воздействия различных молекулярных соединений с тритием на биологические структуры.

Реалистичная оценка риска после поступления трития в организм должна быть основана на достаточно точной дозиметрии. По настоящее время в экспериментах с тритием используются упрощенные методы расчета, которые не учитывают короткий радиус пробега бета-частиц трития и неоднородности распределения в ткани при низкой и средней активности радионуклидов [3]. Более точная дозиметрия должна учитывать биокинетику поступающих соединений в организм и размер выбранной биологической цели.

Многие исследования показывают, что воздействие, связанное с внутренним облучением, может иметь значительные биологические последствия, включая повреждение ДНК, нарушение физиологии и развития, снижение fertильности и продолжительности жизни, а также привести к повышенному риску заболеваний, включая онкологические [4]. Считается, что низкоэнергетическое бета-излучение трития полностью локализуется внутри клеток млекопитающих и имеет высокий гено- и цитотоксический потенциал, поэтому исследование молекулярных и клеточных эффектов воздействия трития имеет важное теоретическое и прикладное значение.

#### *Степень разработанности темы*

Исследованию воздействия трития на биологические объекты посвящено много экспериментальных работ, как *in vivo*, так и *in vitro*. Большинство исследований характеризуется использованием высоких объемных активностей и, соответственно, мощностей доз, которые необходимы для получения острой летальности, индукции канцерогенеза, а также тератогенных, репродуктивных и

цитогенетических эффектов [5]. В результате полученные дозы от трития на несколько порядков превышают оценку средней эффективной дозы для населения и персонала.

Несмотря на то, что биологические эффекты от источников радиации с низкой мощностью дозы могут быть незначительными, нельзя исключить возможность проявления стохастических эффектов от излучения трития в клетках и тканях организмов. Из многих типов радиационно-индуцированных повреждений ДНК наиболее опасными считаются двунитевые разрывы (ДР) ДНК, поскольку именно эти повреждения могут вызвать необратимую остановку пролиферации, гибель клеток и онкотрансформацию [6].

Эксперименты показывают, что в зависимости от включения атома трития в молекулы воды или органические молекулярные структуры, радиационные биологические эффекты будут существенно различаться. Известно, что при одинаковых дозах органически связанный тритий (ОСТ) вызывает больший биологический ответ, чем тритий-протиевая вода (НТО) [7]. Однако сравнительные исследования воздействия разных соединений с тритием на клетки тканей млекопитающих немногочисленны [4].

Несмотря на обширные исследования биологического действия трития, существует неопределенность в количественной оценке риска слабого и/или длительного радиационного воздействия. Работ по исследованию эффектов от низких уровней мощностей доз трития относительно немного в связи со слабым биологическим откликом. В настоящее время количественное исследование фокусов белков репарации ДНК считается самым чувствительным методом анализа повреждений ДР ДНК [8].

Одной из проблем в экспериментах является вопрос дозиметрии соединений с тритием в различных типах клеток. Большинство используемых в экспериментах расчетов дозиметрии применимы только при равномерном распределении трития в тканях. Существует потребность в разработке методики дозиметрии трития, учитывающей короткий пробег бета-частиц трития, размеры

клеточных структур и селективное включение в различные структуры клетки в зависимости от его химической формы.

### *Цели и задачи*

Целью работы является изучение закономерностей изменений количества фокусов белков репарации ДНК в клетках млекопитающих при поступлении соединений трития в различных молекулярных формах с низкой активностью.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методики оценки и программные средства расчета поглощенных доз в клетках в зависимости от размера клеточных структур и распределения источников излучения.
2. Провести сравнительное исследование изменений количества фокусов белков репарации ДНК ( $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM) в зависимости от поглощенной дозы ионизирующего излучения в ядрах мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, инкубированных с  $^3$ H-тимидином или НТО с объемной активностью от 100 до 400 МБк/л в течение 24 ч.
3. Провести сравнительные исследования образования фокусов белков репарации ДНК ( $\gamma$ H2AX) в фибробластах легкого человека (линия MRC-5) при инкубации в течение 24 ч в среде, содержащей  $^3$ H-тимидин или меченные  $^3$ H-аминокислоты (глицин, аланин, пролин) с объемными радиоактивностями от 100 до 400 МБк/л.
4. Исследовать изменения количества фокусов белков репарации ( $\gamma$ H2AX) в клетках селезенки и частоты полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) костного мозга с микроядрами у крыс *Wistar*, получавших в течение 28 суток с питьевой водой  $^3$ H-тимидин или НТО с объемной активностью 200 кБк/л.

### *Научная новизна*

Впервые предложено использовать методику расчета дозиметрии трития в клеточных структурах с комплексным учетом энергетического спектра трития и процесса восстановления радиационных клеточных повреждений.

Впервые установлена зависимость «доза-эффект» для фокусов белков репарации ДНК в клетках при инкубации с соединениями трития, с учетом закономерностей процесса репарации клеточных эффектов и экспериментальных измерений радиоактивности в суспензиях клеток, ядер и ДНК.

Впервые при инкубации клеток в среде с одинаковой активностью соединений трития (НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина) при анализе фокусов систем репарации ( $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и рАТМ) установлены различия в процессах репарации ДР ДНК при воздействии НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина, что обусловлено существенным различием поглощенных доз ядрами клеток.

Впервые явно установлена зависимость количества фокусов белков репарации ДНК от степени включения тритированных соединений в ядро клетки, ДНК и белки хроматина. Низкий эффект от воздействия трития в неорганической форме и значительно более высокий эффект от воздействия ОСТ при одинаковой измеренной радиоактивности в среде, объясняется, в отличие от НТО, дифференцированной степенью включения различных видов ОСТ в молекулы ядра и цитоплазмы клеток.

Впервые в экспериментах на крысах при пероральном потреблении отдельных соединений с тритием с малой радиоактивностью проведены исследования фокусов белков репарации ДНК в ядрах клеток селезенки, а также ПХЭ костного мозга с микроядрами. Отмечены очень низкие значения поглощенных доз в тканях органов, что приводит к необходимости оценки доз для ядер отдельных клеток тканей органов и от единичных распадов трития в ядрах.

#### *Теоретическая и практическая значимость работы*

Изучение последствий излучения трития в средних и малых дозах является важным исследованием, которое позволит оценить степень опасности для здоровья человека низкоэнергетического электронного излучения радионуклидов непосредственно в клетках тканей. Количественное определение фокусов белков репарации ДНК при воздействии разных соединений с тритием с низкой радиоактивностью может быть использовано для оценки опасности облучения в

малых дозах. Применение адекватной и рациональной методики дозиметрии изотопов в ядрах клеток млекопитающих важно для дальнейшего изучения воздействия радионуклидов, особенно в случаях хронического облучения. Полученные зависимости количества фокусов белков репарации от поглощенных ядрами доз трития и их интерпретации необходимо учитывать в процессе совершенствования методов радиационной биодозиметрии.

Результаты диссертации внедрены в научно-исследовательскую деятельность отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

#### *Методология и методы исследования*

Экспериментальная работа была выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

Основой диссертационной работы являются собственные, отечественные и зарубежные исследования, а также современные разработки в области молекулярной и клеточной радиобиологии. Сравнительная оценка степени повреждений ДНК была проведена с использованием иммуноцитохимического анализа фокусов белков репарации ДНК.

При проведении исследований были использованы:

- методы культивирования МСК и фибробластов легкого человека (линия MRC-5);
- методы исследования эффектов перорального поступления тритированных соединений в тканях крыс *Wistar*;
- радиометрия и дозиметрия соединений трития в культуре клеток и тканях организма;
- иммуноцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК;
- методы анализа ПХЭ с микроядрами костного мозга;
- статистические методы обработки полученных данных.

*Положения, выносимые на защиту:*

1. Количественные закономерности биологических эффектов от поглощенных доз ядрами клеток следует определять с учетом клеточных размеров, спектрального распределения бета-излучения трития и функциональной аппроксимации восстановления клеточных структур от повреждений.
2. Различия в изменениях количества фокусов белков репарации ДНК при воздействии различных соединений трития с одинаковой объемной активностью обусловлены различиями в значениях поглощенных доз в клеточных ядрах и кинетики процессов репарации ДНК.
3. Количество фокусов белков репарации ДНК при воздействии бета-распада трития связано со степенью концентрации органических и неорганических соединений трития в клеточном ядре.
4. При пероральном потреблении млекопитающими питьевой воды с активностью трития, близкой к активностям на атомных предприятиях, наблюдаются слабые генотоксические эффекты.

*Публикации по теме диссертации*

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах в ВАК и международных базах цитирования, 4 тезиса докладов.

Материалы диссертации были представлены на следующих научно-практических конференциях:

Юбилейной международной научно-практической конференции «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей» (Москва, 2021);

VIII Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2021);

IV Национальном конгрессе с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды «Сысинские чтения-24», посвященного 145-летию со дня рождения А.Н. Сысина (Москва, 2024);

Международной конференции «Актуальные проблемы радиационной биологии. Модификация радиационноиндуцированных эффектов» (Дубна, 2024);

### *Личный вклад автора*

Личный вклад автора заключался в планировании, проведении и обработке экспериментов, разработке методов и программных средств численного моделирования, анализе и интерпретации полученных данных, написании статей и тезисов. Большая часть представленных экспериментальных результатов и теоретических расчетов выполнена автором лично.

### *Соответствие диссертации паспорту специальности*

Результаты диссертационной работы Родневой Софьи Михайловны «Закономерности изменений количества фокусов белков репарации ДНК в соматических клетках млекопитающих при поступлении различных соединений трития с низкой активностью» соответствуют паспорту специальности 1.5.1 – Радиобиология, в частности к пунктам 1. «Взаимодействие различных видов ионизирующих излучений с веществом. Прямое и косвенное действие ионизирующих излучений на биологические объекты. Медикобиологические последствия действия радиации и разработка методов их минимизации. Стохастические и не стохастические эффекты; зависимости: «доза-эффект» и «время-эффект»; п. 3 «Физико-химические и молекулярные механизмы первичных и начальных процессов лучевых нарушений, протекающих с момента возникновения ионизированных и возбужденных атомов и молекул до появления структурных и функциональных изменений в организме. Физические и биологические основы действия ионизирующего излучения. Острое и хроническое действие радиации», п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембранны; молекулярные механизмы репарации лучевых повреждений; механизмы радиационного гормезиса».

### *Структура и объем диссертации*

Диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 149 источников (из них 130 на иностранном языке). Работа иллюстрирована 32 рисунками, 14 таблиц, 1 приложение.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Исследование научной литературы по радиобиологическим эффектам воздействия трития и его соединений показывает, что большинство экспериментальных исследований *in vivo* и *in vitro* было проведено 25-50 лет назад. Обобщение результатов исследований и их анализ представлены в отчетах по тритию Национального совета по радиационной защите и измерениям США [3], Канадской комиссией по ядерной безопасности [1], Научного комитета ООН по действию атомной радиации [2], Института радиационной защиты и атомной безопасности Франции [9]. Субъективная вероятностная оценка профильными экспертами эффективности бета-излучения трития по сравнению с фотонами была опубликована в отчете [4].

Большинство обзоров акцентируются на систематизации экспериментальных работ по ОБЭ бета-излучения от НТО по отношению к фотонному излучению. В обзора [10] и [11] изложены основные результаты экспериментальных исследований токсичности трития как *in vivo*, так и *in vitro* в период с 60-х по нулевые годы и проведены оценки ОБЭ трития. Теоретический анализ качества излучения и ОБЭ трития представлен в [12]. В этой работе используются литературные данные моделирования методом Монте-Карло трековых структур от ионизирующего излучения на микро- и нано- метровом уровне. Коэффициенты качества излучения трития определяются с учетом микродозиметрии моноэнергетических электронов, а ОБЭ трития оценивается на основе расчета количества ДР ДНК, а также вклада низкоэнергетических электронов в спектре трития и эталонного излучения.

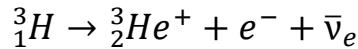
Было проведено множество экспериментальных оценок ОБЭ для НТО с использованием различных показателей, как *in vitro*, так и *in vivo*, и с использованием гамма- и рентгеновских лучей в качестве эталонных излучений. Работ по сравнительному исследованию воздействию различных соединений трития (НТО и ОСТ) относительно немного, причем клеточные и другие эффекты рассматриваются при высоких объемных активностях НТО (свыше 10 МБк/мл). В

обзоре [7] приведены данные ОБЭ ОСТ и НТО в зависимости от их распределения в клетках и тканях организма. В экспериментах выявлено, что эффективность ОСТ намного выше, чем НТО, что связано с их быстрым включением в критические для клетки биомолекулы, включая белки и ДНК, с дальнейшим формированием значительного биологического эффекта.

В настоящей диссертационной работе проведено исследование сравнительного воздействия различных молекулярных соединений трития с низкой активностью на ДНК клеток млекопитающих. Поэтому, обзор литературы акцентируется на исследованиях воздействия соединений трития на клеточном уровне в экспериментах на культурах клеток *in vitro* и с использованием экспериментальных животных.

### 1.1 Распад трития и клеточные эффекты

Ядро трития состоит из протона и двух нейтронов. Этот радиоизотоп водорода распадается со средним периодом полураспада 12,3 года с образованием  ${}^3\text{He}$  и испускает  $\beta$ -лучи низкой энергии. Формула распада трития [13]:



При распаде трития выделяется энергия, которая распределяется между электроном (бета-частицей)  $e^-$  и электронным антинейтрино  $\bar{\nu}_e$  случайным образом. Вследствие случайности распределения энергии между электроном и антинейтрино, бета-частица от распада ядра трития имеет непрерывный спектр. Излучаемая бета-частица имеет среднюю энергию 5,5-5,7 кэВ и максимальную энергию 18,6 кэВ.

Радиоактивный распад атома трития также приводит к передаче некоторой энергии отдачи дочернему положительно заряженному иону гелия  ${}^3_2\text{He}^+$ . Эта энергия зависит от случайного угла дисперсии между испускаемым электроном и антинейтрино и составляет в среднем 1,0 эВ и максимум 3,3 эВ. Энергии иона гелия  ${}^3_2\text{He}^+$  недостаточно ни для самоионизации дочернего атома (необходимая энергия порядка 10 кэВ), ни для ионизации ткани (около 30 эВ). Помимо энергии отдачи, дочерний ион  ${}^3_2\text{He}^+$  также несет энергию возбуждения около 11 эВ,

которая может влиять на судьбу молекулы, с которой был связан атом трития, и приводить к ее химической трансмутации и модификации ее химических свойств.

Несмотря на очень низкую энергию бета-частиц, они обладают достаточной энергией для ионизации атомов и молекул. В воде средняя длина трека бета-частицы составляет 0,56 мкм, а максимальная длина трека – 6 мкм, что сопоставимо с типичным диаметром ядра клетки 6-15 мкм, в то время как типичный диаметр самой клетки составляет 10-30 мкм.

Химическую форму трития в мягких тканях можно разделить на две группы: тритий в составе воды и ОСТ. Первый представляет собой НТО в тканевой воде. Второй представляет собой Т, связанный с атомами серы, азота или кислорода (обменный ОСТ) или с углеродом (необменной ОСТ) органических молекул в клетках и тканях. И незаменяемые, и заменяемые соединения называются ОСТ. Однако незаменяемый тритий будет демонстрировать время удерживания, определяемое метаболизмом соответствующих молекул, в то время как обменный тритий будет неотличим по своему удержанию от НТО в клеточной воде.

После потребления трития (обычно в форме НТО) растениями или животными часть трития может включаться в органические молекулы, такие как углеводы, жиры или белки. ОСТ также может попадать в организм напрямую при приеме пищи, содержащей тритий, при вдыхании летучих органических паров или аэрозолей, или он может образовываться *in vivo* из трития, который присутствует в общих пулах организма после воздействия других тритий содержащих соединений [14].

Близость трития к ключевым молекулам (главным образом дезоксирибонуклеиновой кислоте) будет определять важность ущерба, при его ядерной трансформации и испускания бета-частицы. При распаде трития, включенного в молекулу ДНК, с образованием атома гелия может возникать эффект химической трансмутации, связанный с появлением положительного иона углерода, который может вызывать молекулярные изменения, приводящие к разрывам нитей ДНК.

Эффекты трансмутации трития в 70-90-е годы всесторонне рассматривались во многих работах. В обзорах по эффектам трансмутации [15, 16] отмечено, что степень повреждения, вызванного трансмутацией трития в гелий, теоретически может значительно варьироваться в зависимости от положения атома трития в конкретных нуклеотидах ДНК.

В работах [17, 18] после всестороннего анализа сделан вывод, что трансмутация не вызывает ощутимого усиления клеточных эффектов при распаде трития, которые обусловлены фактически только бета-излучением ядер клеток. Консультативная группа Соединенного Королевства по ионизирующему излучению пришла к аналогичному выводу [5]. Поэтому, если повреждение ДНК у млекопитающих действительно произошло в результате трансмутации, маловероятно, что его можно было бы отличить от радиационно-индуцированного повреждения. Тем не менее, отдельные исследования эффектов трансмутации трития проводятся в настоящее время на основе компьютерного молекулярно-динамического моделирования макромолекул с тритием и анализа их структурных изменений [19].

Наличие широкого спектра клеточного ответа на действие ионизирующего излучения было подтверждено цитогенетическими, молекулярными и геномными исследованиями [8]. В радиобиологии принято несколько подходов анализа клеточных эффектов, из которых предпочтительными являются представления в виде формальных зависимостей «доза-эффект». Геномный подход, основанный на определении последовательностей ДНК, не может быть представлен в форме зависимости «доза-эффект» [20]. В отличие от геномного подхода, функциональный подход дает возможность оценить биологические функции, необходимые для индивидуального ответа на ионизирующее излучение независимо от знания последовательности ДНК или задействованных генов.

Многие ранние работы по изучению радиочувствительности к тритио использовали метод клonalной выживаемости клеток. В основе метода лежит оценка конечного биологического эффекта радиации по показателям гибели определенного процента облученных клеток. Исследовались также мутагенные

эффекты в клетках при воздействии соединений с тритием с использованием метода устойчивости к 6-тиогуанину. Помимо исследований клональной выживаемости и мутагенности использовался цитогенетический анализ, такой как оценка хромосомных aberrаций и микроядер при воздействии трития.

Выживаемость клеток, количество микроядер и хромосомные aberrации коррелируют с наличием в ядрах клеток ДР ДНК [8]. Иммуноцитохимия с использованием антител специфичных к белкам репарации ДНК, с момента ее открытия, стала наиболее удобным и высокочувствительным методом регистрации ДР ДНК в клетках человека [8, 20, 21]. В частности, формы белков  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и рАТМ служат маркерами сайтов репарации ДР ДНК. Исследования закономерностей образования фокусов белков репарации ДР ДНК от дозы ионизирующего излучения проводились в основном с рентгеновским и гамма- излучением, работ же с тритированными соединениями относительно немного.

Результаты исследований представляются в виде зависимостей от объемной активности и времени инкубации клеток с соединениями трития, а также от полученных клетками поглощенных доз. Основной проблемой при сравнительном анализе различных экспериментов с тритием является вопрос дозиметрии трития в клетках различного типа. Несмотря на то, что в большинстве исследований с НТО используется метод дозиметрии трития в тканях, основанный на его равномерном распределении, аналогичный расчет в клетках с теоретической точки зрения представляется не корректным. Кроме того, в случае ОСТ расчет дозы сильно усложняется в связи с неравномерным накоплением различных соединений ОСТ в клеточных структурах. Имеется потребность разработки общей методики дозиметрии для различных видов молекулярных соединений трития.

## 1.2 Экспериментальные исследования на клетках *in vitro*

Эксперименты с высокой объемной активностью трития (свыше 1 МБк/мл) при разной временной экспозиции проводились в основном с НТО. Эксперименты

со средней активностью трития (до 1 МБк/мл) при разной временной экспозиции проводились в отношении меченых тритием аминокислот и нуклеозидов. Результаты отдельных экспериментов с ОСТ сравнивались с воздействием НТО.

Используемые экспериментальные системы включали: лимфоциты и лимфобласты [22-31], клетки костного мозга [28], лейкозные клеточные линии [32], мезенхимальные стволовые клетки [33-36], клетки молочной железы [37], фибробласты лёгкого [38]; клеточные линии животных китайского хомячка [39-43], клетки мышей [42, 44-50], клетки эмбрионов мышей [51-54].

Тритий, вводимый *in vitro* в культуры клеток, вызывает многочисленные клеточные эффекты, включая хромосомные aberrации [22, 23, 24, 26, 28-31, 55], микроядра [29, 31, 45], мутации в клетках млекопитающих [25, 27, 41-47, 54], гибель клеток и задержку пролиферации [25, 27, 32, 33, 37, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 57] и появление фокусов белков-маркеров ДР ДНК  $\gamma$ H2AX и 53BP1 [33-38, 50]. Изучена выживаемость и развитие бластоцистов эмбрионов мышей в присутствие тритированных тимицина и аминокислот [51-54].

### 1.2.1 Выживаемость и пролиферация

Исследования с НТО [27, 42, 45, 48] показывают, что разные клетки могут одинаково реагировать на бета-излучение трития при схожих методиках экспериментов, но у различных клеток гибель 50 процентов клеток (LD<sub>50</sub>) за одинаковое время отмечается при разной объемной активности трития. То, что бета-излучение трития имеет разную эффективность у разного типа клеток, подтверждается и другими более поздними экспериментами. Так, выживаемость эпителиальных клеток молочной железы (MCF-10A) была достаточно высокой (~85%) относительно контроля при инкубации с НТО с объемной активностью 2 МБк / мл [37]. Исследования жизнеспособности клеточных линий китайского хомячка с различными генетическими дефектами [43] при инкубации с <sup>3</sup>Н-тимицином (1,85-185 кБк/мл) в течение 20 ч показали, что мутантные клетки с низкой репарацией по пути негомологичного соединения концов (НГСК) оказались значительно более чувствительными (в 15 раз) к <sup>3</sup>Н-тимицину в

широком диапазоне доз. В работе [32] на пяти линиях гемопоэтических клеток человека (промиелоцитарный лейкоз HL-60, лейкозные Т-клеточные линии Molt-4 и Jurkat, В-клеточные линии Raji и SKW6-CL4) показано, что гибель разных типов клеток может быть связана также с разными клеточными механизмами. У специфически чувствительных к радиации культур гемопоэтических стволовых клеток мышей KLS было обнаружено за 48 часов почти двукратное снижение пролиферации при достаточно низких объемных активностях  $^{3}\text{H}$ -тимицина (3,7 кБк/мл) [50].

В нескольких работах проводились сравнительные эксперименты воздействия нуклеотидов и аминокислот на клоногенную выживаемость клеток мышей. В [47] исследовалась выживаемость клеток мышевого лимфоцитарного лейкоза (L5178Y), которая заметно различалась среди ряда соединений ОСТ при инкубации в течение 50 часов. Различий между метил- $^{3}\text{H}$ - и 6- $^{3}\text{H}$ -тимицином обнаружено не было. Наибольшая эффективность была у  $^{3}\text{H}$ -тимицина, далее последовательное понижение у  $^{3}\text{H}$ -аргинина,  $^{3}\text{H}$ -лизина,  $^{3}\text{H}$ -лейцина и  $^{3}\text{H}$ -аспарагиновой кислоты. Пролиферация и дифференцировка эмбриональных клеток среднего мозга мышей (МВС) исследовалась при инкубации с ОСТ в течение 20 часов в [49]. Ингибирующий эффект (ID<sub>50</sub>) всех видов ОСТ на дифференцировку клеток был больше, чем на пролиферацию, при этом метил- $^{3}\text{H}$ -тимицин продемонстрировал наибольший ингибирующий эффект ID<sub>50</sub> (пролиферация и дифференцировка) (29 и 21 кБк/мл) среди четырех видов ОСТ, за ним следуют  $^{3}\text{H}$ -аргинин (193 и 163 кБк/мл) и  $^{3}\text{H}$ -уридин (193 и 141 кБк/мл), при этом  $^{3}\text{H}$ -глутаминовая кислота (525 и 438 кБк/мл) оказалась наименее эффективной.

В ряде работ исследовалась выживаемость и развитие бластоциты эмбрионов мышей в присутствие  $^{3}\text{H}$ -тимицина и  $^{3}\text{H}$ -аминокислот [51-54]. Воздействие НТО на эмбрионы с высокой объемной активностью (десятки и сотни МБк/мл) показывает одинаковый эффект с  $^{3}\text{H}$ -тимицином при объемной активности последнего в 1000 раз меньшей. Сравнение воздействия тритированных нуклеотидов (тимицина) и аминокислот (аргинина) на клетки

эмбрионов мышей [53, 54] с воздействием на клетки МВС и лимфоцитарного лейкоза мышей [47, 49] показывает разные тенденции. В случае эмбрионов  $^3\text{H}$ -аргинин был более токсичен чем  $^3\text{H}$ -тимидин, а в не эмбриональных клетках наоборот:  $^3\text{H}$ -тимидин более эффективен, чем  $^3\text{H}$ -аргинин. Одним из объяснений такого факта, может быть то, что  $^3\text{H}$ -аргинин более активно включается в эмбрионы мышей во время раннего инкубационного периода по сравнению с  $^3\text{H}$ -тимидином.

### 1.2.2 Мутагенные эффекты

Мутагенные эффекты в клетках при воздействии соединений с тритием исследовались с НТО [27, 45] и ОСТ [25, 44, 47] в основном на устойчивость к 6-тиогуанину.

Устойчивость к 6-тиогуанину при воздействии НТО изучалась на клетках лимфобластов человека ТК6 [27] и лимфоцитарных лейкозных клеток мышей L5178Y [45], а при воздействии  $^3\text{H}$ -тимидина на клетках лимфобластов человека ТК6 [25] и клеток китайского хомячка [44]. В работе [47] проводились комплексные сравнительные исследования устойчивости к 6-тиогуанину при воздействии  $^3\text{H}$ -нуклеозидов и  $^3\text{H}$ -аминокислот (метил- $^3\text{H}$ - и 6- $^3\text{H}$ -тимидина,  $^3\text{H}$ -лизина,  $^3\text{H}$ -аргинина и  $^3\text{H}$ -лейцина), которое сравнивалось с результатами воздействия НТО из [45].

Частота мутаций линейно возрастает с увеличением объемной активности соединений. Тритированный тимидин оказался более эффективным, чем  $^3\text{H}$ -аргинин и  $^3\text{H}$ -лизин. У разных видов клеток мышного лимфоцитарного лейкоза и китайского хомячка наблюдалось разное воздействие 6- $^3\text{H}$ - и метил- $^3\text{H}$ -тимидина, причем у клеток китайского хомячка наблюдалась повышенная мутагенность.

### 1.2.3 Хромосомные aberrации и индукция микроядер

Большинство исследований с НТО по хромосомным aberrациям были проведены с лимфоцитами крови человека в отношении нестабильных хромосомных aberrаций (дицентриков и центрических колец) при достаточно высокой объемной активностью НТО (выше 1 МБк/мл) [22, 24, 26, 28-31]. В этих

исследованиях изучались хромосомные aberrации в фазе  $G_0$  в лимфоцитах человека с использованием схожих технологий проведения экспериментов и методов расчета доз от НТО. Определялись aberrации хромосомного типа – частота дицентриков и центрических колец. Примерно в половине исследований воздействие трития было краткосрочным – от 0,1 до 2 часов, в части работ клетки подвергались облучению в течение 24-48 часов.

В исследованиях с НТО с объемной активностью трития в 1-1000 МБк/мл с не делящимися клетками лимфоцитов в стадии  $G_0$  наблюдались в подавляющем большинстве нестабильные хромосомные aberrации (дицентрики и центрические кольца) и только небольшое число хроматидных aberrаций. Представленные данные показывают, что частота хромосомных aberrаций может отличаться при воздействии НТО в разных экспериментах со схожими условиями даже для клеток одинакового типа и единой методике расчета доз. Это можно объяснить тем, что при расчете дозы в работах используются различные коэффициенты учета воды в клетках (от 0,7 до 1,05), что может привести к существенным различиям в полученных зависимостях.

Совершенно другая картина была при инкубации делящихся клеток с НТО и  $^3\text{H}$ -тимидином. Самые первые исследования хромосомных aberrаций в культуре делящихся клеток китайского хомячка [39] с высокой активностью НТО (от 10 до 200 МБк/мл) в течение 10 часов показали, что около 95% всех aberrаций были представлены одиночными фрагментами хроматидного типа. Аналогично в других ранних исследованиях наблюдались только aberrации хроматидного типа при инкубации  $^3\text{H}$ -тимицина с лимфоцитами крови человека, клетками HeLa и китайского хомячка [40, 56].

Анализ хромосомных aberrаций в первых метафазах лимфоцитов человека при относительно низкой объемной активности (0,037-370 кБк/мл) и длительном воздействии НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина (48 ч) показал повышение частоты aberrаций только хроматидного типа [23]. При повышении активности НТО до 3,7 МБк/мл отмечено повышение частоты aberrаций хромосомного типа (0,02-0,03 дицентриков на клетку).  $^3\text{H}$ -тимицин индуцировал существенно больше

аберраций хроматидного типа, чем НТО, и с ростом объемной активности наблюдается увеличение отношения аберраций хроматидного типа с 5 до 30.

Образование микроядер было исследовано в периферических лимфоцитах [29, 31] и лимфоцитарных лейкозных клеток мышей (L5178Y) [45], при этом выявлены сопоставимые зависимости «доза-эффект» для разных типов клеток и доз облучения НТО. Значимые показатели микроядер по отношению к контролю наблюдались при объемных активностях НТО от 1 МБк/мл.

Фактически отсутствуют исследования микроядер в клетках под воздействием ОСТ. Только в одной работе [54] с эмбрионами проведена оценка образования микроядер при инкубации с метил-<sup>3</sup>Н-тимидином и <sup>3</sup>Н-аргинином при относительно небольшой объемной активности (0,37 и 0,925 кБк/мл). Наличие микроядер фиксировалось только при уровне воздействия в 0,925 кБк/мл и <sup>3</sup>Н-аргинин оказывал более сильное влияние на образование микроядер, чем <sup>3</sup>Н-тимидин, что объясняется более быстрым поглощением <sup>3</sup>Н-аргинина эмбрионами, чем поглощение <sup>3</sup>Н-тимидина.

Исходя из анализа результатов исследований *in vitro* хромосомных аберраций и микроядер в клетках можно утверждать, что аберрации хромосомного типа проявляются в делящихся лимфоцитах при активности НТО в среде свыше 0,7 МБк/л и инкубации в течение двух дней. При одинаковой объемной активности эффект от воздействия <sup>3</sup>Н-тимидина кратно выше, чем при воздействии НТО. Все приведенные выше исследования указывают на то, что тритий при воздействии на делящиеся клетки разного вида, индуцирует преимущественно аберрации хроматидного типа.

При воздействии <sup>3</sup>Н-тимидина не наблюдалось аберраций хромосомного типа. Данное обстоятельство объясняется различиями в чувствительности клеток к бета-лучам на разных стадиях клеточного цикла. Клетки в фазе G<sub>2</sub>, как правило, более чувствительны, чем клетки в фазах G<sub>0</sub> и G<sub>1</sub>. Также известно, что образование хроматидных аберраций связано с разрывами хромосом в фазе G<sub>2</sub>. Тритированный тимицин активно включается в хромосомную ДНК во время

репликации ДНК в фазе S и эффективен только после дупликации хромосомы уже в фазе G<sub>2</sub>.

Оценка дозы с помощью метода микроядерного анализа хорошо согласуется с дицентрическим анализом. Оценка микроядер является более быстрой, простой и экономически эффективной по сравнению с оценкой хромосомных аберраций, но индивидуальная вариабельность зависимости от дозы и неизвестная фоновая частота ограничивают его применение в области низких доз.

#### 1.2.4 Оценка фокусов белков репарации ДНК

Распространенными подходами в определении индивидуальной радиочувствительности исследуемых объектов являются методы оценки радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК. Непрямая иммунофлуоресценция с помощью антител к белкам репарации ДНК, с момента ее открытия, стала наиболее удобным методом регистрации ДР ДНК в клетках человека. После образования ДР ДНК гистон H2AX фосфорилируется по серину-139 ( $\gamma$ H2AX) и обнаруживается как фокусы (динамические микроструктуры состоящие из многочисленных копий белка) в ядрах клеток на поврежденных участках в линейной зависимости количества фокусов от количества индуцированных ДР ДНК [8].

В работах [43, 50] рассматривалось воздействие <sup>3</sup>H-тимицина (с активностью до 185 кБк/мл) на культуры клеток со специфическими особенностями. В [50] исследовались гемопоэтические стволовые клетки мышей культуры KLS, а в [43] нескольких клеточных линий китайского хомячка: SMRAD51 содержащих внутрихромосомный субстрат с контролем пути ГР, XR-1 с дефектом по гену XRCC4 и пути НГСК. Среднее количество фокусов  $\gamma$ H2AX/клетки, так и частота клеток с фокусами  $\gamma$ H2AX увеличивались в зависимости от повышения активности трития. Среднее количество фокусов  $\gamma$ H2AX оказалось значительно выше в клетках с дефектом пути НГСК.

Современные исследования воздействия НТО на МСК костного мозга [33] и на фибробlastы эпителиальных клеток молочной железы человека MCF-10A [37]

при объемной активности трития 20 МБк/мл показали единичный эффект образования фокусов  $\gamma$ H2AX (3-5 фокуса на клетку). В исследованиях [34-36] при более низкой объемной активностью НТО (до 800 кБк/мл) в МСК человека также наблюдалось малое количество фокусов  $\gamma$ H2AX.

### 1.3 Экспериментальные исследования воздействия трития *in vivo*

#### 1.3.1 Основные результаты исследований до 2010 года

В экспериментальных исследованиях *in vivo* животных (в большинстве случаев крыс и мышей) подвергают инъекции в брюшину, или они потребляют перорально растворы тритированных соединений и тритированную пищу. Воздействие может быть однократным, либо хроническим в течение длительного времени (дней и месяцев). Через определенное время оценивается воздействие трития на здоровье, осуществляется забой животных, исследуются их органы на активность трития, а также различные тканевые и клеточные эффекты. Оценивается детерминированное или стохастическое воздействие соединений с тритием.

Детерминированные эффекты проявляются в относительно короткие сроки после превышения достаточно высокого порога дозы от трития, их степень тяжести увеличивалась по мере увеличения дозы. Так при хроническом приеме трития с питьевой водой [57], самая низкая объемная активность, выше которой наблюдается увеличение смертности мышей, составляет 150 ГБк/л. Сообщалось о неврологических и репродуктивных эффектах при объемных активностях НТО до 100 МБк/л. Длительное воздействие НТО в относительно высоких дозах приводит к снижению иммунного ответа животных, которое может быть обратимым или необратимым в зависимости от дозы [2].

Стохастические эффекты не имеют пороговых значений дозы и имеют большую вероятность возникновения при увеличении дозы. Предполагается, что стохастические эффекты могут возникать при поражении клеток даже при весьма низких дозах радиации, хотя частота возникновения инцидентов, возникающих в результате облучения низкими дозами, должна быть весьма низкой.

К стохастическим эффектам относятся: канцерогенность, наследственные эффекты (переданные следующим поколениям из-за летального характера мутации), эффекты зародышевых клеток (вызванные повреждением генетического материала одной клетки), клеточные мутации и хромосомные aberrации.

Лабораторные исследования на животных продемонстрировали, что тритий в форме НТО при хроническом потреблении питьевой воды (1-10 ГБк/л) и нескольких инъекций (0,5 до 4,0 МБк/г массы тела) может вызывать рак у мышей и крыс [57, 59]. В обзоре российских исследований [62] отмечено, что тритий индуцировал многие типы опухолей, а также лейкемию, у мышей и крыс. Анализ рисков возникновения рака от воздействия тритиевого излучения излагается в обзоре [11].

В нескольких работах [60-62] представлены эффекты воздействия трития на половые клетки млекопитающих в одном или нескольких поколениях, которые приводят к гибели потомства. Эффекты интерпретируются как стохастические, предположительно вызванные повреждением генетического материала одной клетки, но не переданные следующим поколениям из-за летального характера мутации, вызванной излучением. Эти работы продемонстрировали, что внутреннее воздействие НТО и  $^{3}\text{H}$ -тимицина на половые клетки млекопитающих может индуцировать доминантные летальные мутации (DLM) (доимплантационная смерть) потомства в широком диапазоне доз облучения. В серии экспериментов на самцах мышей [62] изучали частоту DLM в половых клетках, индуцированных  $^{3}\text{H}$ -глюкозой, двумя аминокислотами ( $^{3}\text{H}$ -глицином и  $^{3}\text{H}$ -лизином) и двумя нуклеозидами ( $^{3}\text{H}$ -тимицином и  $^{3}\text{H}$ -дезоксицитидином) после внутрибрюшинных инъекций. Меченные тритием глюкоза и аминокислоты вводились однократно, а нуклеозиды – шестью порциями в течение трех дней. Эффекты оценивали в сравнении с НТО через три-пять месяцев. По частоте DLM порядок эффективности различных химических форм на единицу введенной активности на грамм массы тела следующий:  $^{3}\text{H}$ -глицин – НТО и  $^{3}\text{H}$ -глюкоза –  $^{3}\text{H}$ -дезоксицитидин –  $^{3}\text{H}$ -L-лизин –  $^{3}\text{H}$ -тимицин. Частоты DLM, индуцированные

меченым лизином, тимидином и дезоксицитидином, в пять-восемь раз выше, чем при такой же активности НТО.

Оценка хромосомных аберраций в клетках в экспериментах с НТО на мышах проводилась всего в нескольких исследованиях. В сперматоцитах у мышей [63], подвергшихся воздействию НТО в возрасте 6-10 недель после однократной внутрибрюшинной инъекции и, в дальнейшем, с питьевой водой для поддержания относительно постоянных уровней трития. В клетках костного мозга мышей [64], подвергшихся воздействию НТО в течение 20 дней беременности либо с питьевой водой (1,1 ГБк/л), либо с кресс-салатом (21 ГБк/л), по частоте хромосомных аберраций не выявлено признаков повышения чувствительности внутриутробно, а также существенной разницы между эффектами двух различных форм. В [65] определяли хромосомные аберрации в первичных сперматоцитах и лимфоцитах периферической крови мышей при одноразовых инъекциях НТО в 150, 300 и 450 МБк на мышь и оценены полученные дозы с учетом экспоненциального уменьшения с периодом биологического полураспада в 2 дня. В [65] наблюдали существенное увеличение частоты аберраций как хромосомного, так и хроматидного типа по отношению к контролю.

### 1.3.2 Современные исследования воздействия трития

Современные исследования воздействия трития на животных проводятся в Японии [66], Корее [67], Франции и Канаде [9], России [68]. Усилия направлены на обнаружение биологических эффектов от низких доз радиации трития.

В Японии в целях создания сверхчувствительных систем оценки биологического действия НТО была организована совместная исследовательская группа по биологии трития, которая поддерживается Национальным институтом термоядерной науки [66]. Используются мышиные модели синдромов рака человека, такие как  $Apc^{Min/+}$ . Мыши  $Apc^{Min/+}$  очень чувствительны к агентам, повреждающим ДНК, таким как ионизирующее излучение, и их используют для оценки индукции рака после воздействия низких доз радиации. Другой чувствительной системой анализа на лабораторных животных является анализ

TCR (T-cell receptor рецептор Т-клеток) и анализ Pig-а. Ген TCR в Т-лимфоцитах использовался для анализа мутаций *in vivo* и *in vitro* как в клетках человека, так и животных. Частота мутаций также наблюдается с использованием гена Pig-а на X-хромосоме млекопитающих. Было обнаружено, что количество аденона кишечника увеличивалось в результате радиационного воздействия дозозависимым образом в двух моделях мышей ApoMm/+.

В рамках совместной французско-канадской программы исследовалось влияния НТО в питьевой воде на продолжительность жизни и возникновение злокачественных новообразований у мышей [9]. Показано, что на продолжительность жизни мышей, подвергшихся воздействию НТО, не повлияло воздействие трития при 150 и 500 МБк/л полученных в течение 14 дней. Только воздействие 1,2 и 3,0 ГБк/л НТО в течение 14 дней значительно снижало среднюю продолжительность жизни.

В рамках международного сотрудничества [69-74] проводилось крупномасштабное исследование на мышах с целью определения биологических эффектов от хронического воздействия малых доз трития. Результаты представлены в итоговом отчете [9].

Современные цитогенетические исследования на мышах [69, 71, 72] проводились с объемными активностями трития в питьевой воде 0,01-20 МБк/л с НТО, либо в виде водного раствора  $^3\text{H}$ -меченых аминокислот (аланин, пролин и глицин). Данные аминокислоты были выбраны потому, что они являются важным компонентом клеточного метаболизма и не фиксируются предпочтительно в ДНК, как  $^3\text{H}$ -тимидин. Проведены исследования: микроядерного тестирования костного мозга мышей; анализ с помощью M-FISH хромосом лимфоцитов крови мышей; измерение скорости апоптоза спленоцитов мышей проточной цитометрией; веса селезенки и соматической внутрихромосомной рекомбинации (инверсиями ДНК) в ткани селезенки; количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  проточной цитометрией; экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, с помощью теста амплификации рибонуклеиновой кислоты (РНК). Также изучались маркеры тканевой токсичности трития, которые включали макроскопические и

микроскопические изменения тканей (масса, морфология, патология, клеточные характеристики), изменения баланса RedOx, воспалительную реакцию, функциональные/метаболические изменения и органную токсичность.

Цитогенетическое повреждение клеток костного мозга мышей измеряли с помощью микроядерного теста [72]. Костный мозг – одна из самых радиочувствительных тканей из-за активных процессов кроветворения и лимфопоэза. Месячная обработка мышей 10 кБк/л, 1 или 20 МБк/л тритием в питьевой воде в качестве НТО или ОСТ (общий раствор аланина, пролина и глицина) не приводила к статистически значимым изменениям частот полихроматических эритроцитов с микроядрами. Другая оценка частот микроядер в образцах крови крыс при однократном пероральном введении НТО 37 кБк или 370 кБк/0,5 мл [67] также не показала значительной разницы между контрольными и экспонированными крысами на 14 и 21 день после перорального введения. Анализ ПХЭ костного мозга показал статистически значимое увеличение частоты ПХЭ с микроядрами при активности трития 800 кБк/л в питьевой воде крыс [68].

В [72] было обнаружено, что как НТО, так и ОСТ вызывают повышенный уровень хромосомных aberrаций при 1 и 20 МБк/л после 1-месячного воздействия. При воздействии в 8 месяцев, с НТО не наблюдалось чрезмерных повреждений хромосомных aberrаций, но с ОСТ они увеличивались с дозой. При 10 кБк/л ни НТО, ни ОСТ не вызывали какого-либо повреждения хромосом, что позволяет предположить порог зависимости «доза-эффект».

В [72] не наблюдался повышенный уровень апоптоза в спленоцитах мышей, получавших НТО, по сравнению с контрольными животными. Также результаты не показали общих изменений ни веса органов селезенки, ни частоты внутрихромосомной рекомбинации селезенки мышей. Также воздействие трех уровней концентрации НТО и ОСТ в течение одного месяца не приводило к увеличению количества очагов γH2AX в спленоцитах. Было отмечено снижение уровня повреждения ДНК по сравнению с контролем через 8 месяцев при воздействии ОСТ при 1 и 20 МБк/л.

При измерении экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, после 1 и 8 месяцев в группах, подвергшихся НТО, наблюдалась активация генов репарации ДНК, но более выраженная через 1 месяц, чем через 8 месяцев. Однако во всех группах, подвергшихся ОСТ, наблюдалась очень разная реакция. В частности, было обнаружено, что очень большое количество генов (от 51 до 57 в зависимости от доз из 84 исследований) подавляется в клетках мышей, подвергшихся воздействию ОСТ, что предполагает ингибирование механизмов восстановления ДНК.

Исследование маркеров тканевой токсичности трития у мышей показало, что глобальные изменения, наблюдаемые в печени, селезенке и кишечнике, были наименьшими, в то время как в мозге, сосудах и почках были самые сильные тканевые реакции. Исследование различных параметров в крови, селезенке и кишечнике у мышей выявило изменения в метаболизме железа, вызванные приемом ОСТ [74]. В целом отмечается, что при эквивалентной дозе количество изменений, наблюдаемых в различных исследованных тканях и органах, выше при ОСТ, чем при НТО. Кроме того, при самой низкой объемной активности трития в 10 кБк/л у мышей наблюдались лишь небольшие изменения некоторых параметров в мозге и крови, в то время как в других тканях изменения отсутствовали [73].

### 1.3.3 Биокинетика и метаболизм трития в организме

Важным аспектом в исследованиях *in vivo* является кинетика трития в организме животных и соответствующее распределение трития в различных тканях органов в зависимости от временного фактора. Этим вопросам посвящено много экспериментов на мышах и крысах, а в отдельных работах и на других животных. На основе полученных данных строятся биокинетические модели при приеме НТО и содержащих тритий органических соединений, которые экстраполируются на организм человека.

Внутри организма тритий ( $^{3}\text{H}$ ) будет распределяться между двумя основными видами: обменным и незаменяемым. Обменный  $^{3}\text{H}$  включает как НТО

в тканях организма, так и ОСТ, который свободно обменивается водородом с клеточной водой (заменяемый ОСТ). Незаменяемый  $^3\text{H}$  состоит из ОСТ, где обмен водорода незначительный или отсутствует. В физиологических условиях атомы водорода, связанные с атомами кислорода, азота или серы, легко обмениваются водородом с окружающей водой, но обмен атомами водорода, связанными с атомами углерода, практически отсутствует [75].

Зависимость от химического состава и метаболизма показывает абсорбирование тритиевых соединений желудочно-кишечным трактом.  $^3\text{H}$ -глюкоза и  $^3\text{H}$ -аминокислоты полностью (100%) абсорбировались желудочно-кишечным трактом [62], а абсорбция  $^3\text{H}$ -тимицина была значительно ниже (10-20%) предположительно из-за его разложения до  $^3\text{H}$ -тимина в желудочно-кишечном тракте,  $^3\text{H}$ -дезоксицитидин абсорбировался почти полностью (60-100%). После перорального введения тимицина, меченного тритием, людям или животным около 2% включается в ДНК на стадии синтеза клеточного цикла, а оставшаяся часть отображается как НТО [76]. Исследование [77] показало, что уровни удельной активности необмененного трития в различных тканях после перорального приема были ниже, чем после внутрибрюшинной или внутривенной инъекции. Этот результат предполагает, что катаболизм  $^3\text{H}$ -тимицина в НТО также происходит в желудочно-кишечном тракте.

Установлено, что при однократном приеме тритий содержащих соединений происходит достаточно быстрое выведение большей части трития из организма. Период полувыведения зависит от размеров животных, так при приеме НТО тритий у крыс быстро выводился с периодом полувыведения около 3,5 дней [67, 78, 79,], у мышей ~1-2,6 дня [80, 71]. При приеме НТО у животных [81-83] около 1-5% включается в незаменяемый ОСТ в тканях тела с периодом полувыведения для крыс ~10 дней.

Период полураспада аминокислот, включенных в долгоживущие белки печени, почек и сердечной мышцы, обычно составляет около 6-12 дней у мышей или 7-20 дней у крыс. Это время оборота определяет как удержание ОСТ в

организме после прекращения воздействия трития, так и скорость включения трития в ОСТ после начала воздействия трития [15].

Оценки на анализе метаболизма углерода в организме позволяет предположить, что оборот трития у людей будет примерно в четыре раза медленнее, чем у крыс. Измеренные скорости обмена общего белка в организме позволяют предположить, что среднее время пребывания ОСТ у человека составляет около 80 дней [15]. Подробное изложение биокинетических моделей для трития представлено в обзоре [2].

Ряд авторов провели сравнительное исследование метаболизма трития в результате хронического воздействия тритиевой воды и некоторых различных видов продуктов с тритием [71, 80, 84-88].

Эти исследования показали, что тритий во влажных тканях почти равномерно распределен, но его радиоактивность в тканях крыс через 22 дня, получавших ОСТ в форме тритиевой пищи (пшеница), были примерно в 2-4 раза выше, чем у крыс, получавших НТО [83]. Радиоактивность трития в отдельных тканях была разной в зависимости от химической формы потребляемого трития. Более высокая радиоактивность по отношению к НТО наблюдалась во всех тканях крыс, подвергшихся воздействию  $^3\text{H}$ -лизина,  $^3\text{H}$ -тимидина и  $^3\text{H}$ -уридина, тогда как более низкие концентрации были обнаружены в большинстве тканей после воздействия  $^3\text{H}$ -глюкозы и  $^3\text{H}$ -глюкозамина [84]. В современных исследованиях на мышах [71] получено, что общий характер поглощения и удержания  $^3\text{H}$  в мягких тканях тела после приема некоторых  $^3\text{H}$ -аминокислот (аланин, пролин и глицин) был почти таким же, как при приеме НТО.

#### 1.4 Заключение к обзору литературы

Эксперименты *in vitro* показали, что эффективность бета-излучения трития зависит от типа клеток и тритированного соединения (НТО и ОСТ). Существенный клеточный эффект от воздействия НТО возникает при ее достаточно высокой объемной активности свыше 10 МБк/мл. Сопоставимый

эффект наблюдается при инкубации делящихся клеток с удельной активностью  $^3\text{H}$ -тимицина в 100 раз меньше (для эмбрионов в 1000 раз).

Число распадов  $^3\text{H}$  на ядро и клетку при инкубации с ОСТ коррелировало со степенью выживания клеток. Распределение  $^3\text{H}$ -тимицина внутри ядра и  $^3\text{H}$ -аминокислот внутри клетки было практически однородным. В свою очередь, распределение НТО было однородным по всей среде, включая клетки. При исследовании выживаемости, а также пролиферации и дифференцировки клеток,  $^3\text{H}$ -тимицин показал существенно более высокий эффект, чем  $^3\text{H}$ -аминокислоты при одинаковой объемной активности трития в растворах. В свою очередь, эффект от  $^3\text{H}$ -аминокислот ( $^3\text{H}$ -аргинин,  $^3\text{H}$ -лизин,  $^3\text{H}$ -лейцин) был на порядки выше, чем НТО. В эмбрионах мышей  $^3\text{H}$ -аргинин имел несколько большую эффективность, чем  $^3\text{H}$ -тимицин, что объясняется задержкой включения  $^3\text{H}$ -тимицина в клетки эмбрионов.

Отмечаются различия в типе и частоте хромосомных аберраций в зависимости от способности клеток к делению и формы тритированного соединения. При сравнимых относительно низких объемных активностей трития (до 0,3 МБк/мл) эффективность  $^3\text{H}$ -тимицина по отношению к НТО была существенно больше. В делящихся клетках воздействие  $^3\text{H}$ -тимицина приводит к возникновению аберраций хроматидного типа из-за его включения в хромосомную ДНК во время репликации ДНК в S фазе. Наоборот, в отсутствии деления клеток (фаза G<sub>0</sub>) воздействие НТО приводит к аберрациям хромосомного типа (в большей степени дицентрики и центрические кольца), но ощутимый эффект возможен только при высоких объемных активностях трития с НТО (выше 1 МБк/мл).

Значимые показатели микроядер по отношению к контролю наблюдались при объемных активностях НТО от 1 МБк/мл. В случае ОСТ наличие микроядер фиксировалось только у эмбрионов при низком уровне воздействия  $^3\text{H}$ -тимицина и  $^3\text{H}$ -аргинина в 0,925 кБк/мл.

Иммунофлуоресцентный анализ проводился в основном с акцентом на фокусы γH2AX, которые рассматривали обычно через 24 часа культивирования в

присутствии  $^3\text{H}$ -тимицина или НТО. Инкубация клеток с НТО вызывает небольшое количество фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  даже при объемной активности 20 МБк/мл. Воздействие  $^3\text{H}$ -тимицина приводит к значимому к дозозависимому увеличению фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1 в активно пролиферирующих клетках даже при относительно малых объемных активностях до 10 кБк/мл, причем фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  было значительно больше в клетках с дефектом пути НГСК репарации ДНК.

Исследования по радиоактивному воздействию трития *in vivo* показали, что распределение и удерживание трития в значительной степени зависит от его химической формы, когда он попадает в организм. Отмечено равномерное распределение НТО и неравномерное распределение ОСТ среди мягких тканей тела, даже в одном органе тритий ОСТ неравномерно распределен между различными органическими молекулами. Внутри же клеток ОСТ (за исключением предшественников ДНК) распределяется почти равномерно. Включение трития в состав органических тканей от меченого тритием органического соединения было выше, чем от тритиевой воды, несмотря на то, что часть органических соединений с тритием кatabолизируется до тритиевой воды и равномерно распределяется в организме. Скорость выведения трития из тканей была ниже для меченых тритием органических соединений, чем для НТО.

В настоящее время доступно лишь небольшое количество экспериментальных данных, описывающих биологические эффекты низких доз облучения или облучения с низкой мощностью дозы. Представляется значимым исследование клеточных реакций на низкие дозы или воздействие низкой мощности дозы на молекулярном уровне. За последние 20 лет были разработаны новые методы и процедуры, которые комбинируют несколько подходов и являются более чувствительными. К таким современным методам относится, в частности, иммуноцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК. Необходимы дополнительные исследования биокинетики, клеточной токсичности и микродозиметрии с использованием различных показателей, в том числе на клеточном и ядерном уровне.

## ГЛАВА 2. ДОЗИМЕТРИЯ СОЕДИНЕНИЙ С ТРИТИЕМ

В радиационной биологии поглощенная доза относится к количеству энергии излучения, вложенной в единицу массы, обычно в ткани или отдельных клетках. Помимо выделенной энергии количество биологического ущерба определяет и другие факторы, такие как тип излучения и химическая форма радиоизотопа.

Тритий может иметь различное клеточное распределение в зависимости от химической формы, в которую он включен. Поскольку энергия, переносимая бета-излучением трития, имеет малый радиус действия, вся его энергия поглощается тканями и органами, в которых расположены атомы трития, при этом цель излучения должна быть определена на клеточном или молекулярном уровне, а методы дозиметрии необходимо будет адаптировать к расчетам энергетических выделений в этом масштабе. Поэтому расчет доз на клеточном и субклеточном уровне является первостепенной задачей радиометрии трития.

Включение бета-излучателей с низкой энергией в клетку приводит к локально большому поглощению энергии клеточными и субклеточными структурами, поскольку пробег бета-частиц невелик (в воде средняя длина трека бета-частицы трития составляет 0,56 мкм, а максимальная длина трека – 6 мкм), а излучатели селективно включаются в различные участки с разной химической формой.

В радиобиологии общепризнано, что радиочувствительные участки связаны с ДНК. Радиационный риск неоднородно распределенного трития можно оценить на основе поглощенной дозы на ядро клетки. Таким образом, ядро клетки считается областью-мишенью. Дозиметрические модели разрабатывались для равномерного распределения радиоактивности по всему ядру и/или цитоплазме. Это позволяет рассчитать общую поглощенную долю ядра клетки на единицу кумулятивной активности.

## 2.1 Методы расчета дозы от излучения трития

Обычно, предполагается, что изотоп равномерно распределен в ткани и ткань имеет одинаковый состав. Размер рассматриваемого объема ткани значительно больше пробега бета-частиц от радионуклида. В большинстве исследований расчет мощности дозы от бета-излучения трития осуществляется по формуле [89, 90]:

$$\dot{D} = K \cdot E \cdot C \text{ (Гр/с),} \quad (1)$$

где  $K=1,6 \cdot 10^{-13}$  кг·Гр/МэВ – постоянная преобразования единиц измерения,  $E=5,7$  кэВ – средняя энергия бета-частиц трития,  $C$  – удельная активность в среде (Бк/кг).

Значение мощности дозы при 1 распаде в секунду на 1 грамм массы ткани (эквивалентной воде) составляет  $9,12 \cdot 10^{-13}$  Гр/с, мощность дозы в день соответственно  $7,87 \cdot 10^{-8}$  Гр/день (в одном дне 86400 секунд). Формула поглощенной дозы (Гр) в ткани в период времени от  $t_1$  до  $t_2$  (в днях) следующая [67, 91]:

$$D(t_1 \rightarrow t_2) = 7,87 \cdot 10^{-8} \cdot \int_{t_1}^{t_2} A \cdot TDF(t) dt \text{ Гр/день,} \quad (2)$$

где  $A$  – исходная активность трития во всем организме на единицу массы (Бк/г),  $TDF$  (tissue distribution factor) – коэффициент тканевого распределения активности (отношение удельной активности в ткани к удельной активности трития во всем теле) за время исследования  $t$  [77, 92]. В ряде работ значение  $A$  принимается как объемная активность трития в питьевой воде или пище, а значение  $TDF$  выражается как процент радиоактивности трития в тканях по отношению к радиоактивности трития в питьевой воде или пище [83, 86].

Формулы (1) и (2) используются для расчета доз радиации от НТО почти во всех экспериментальных работах *in vivo*, что дает усредненные оценки дозы по всему объему ткани органов, причем неявно подразумевается достаточно высокая активность НТО. В случае экспериментов *in vitro* для расчета мощности дозы радиации от НТО используется та же формула (1), с поправкой на коэффициент

содержания воды в клетке, поэтому формулу мощности дозы клетки для НТО можно представить в следующем виде:

$$\dot{D} = 9,12 \cdot 10^{-13} \cdot C \cdot \eta \text{ (Гр/с)}, \quad (3)$$

где  $C$  – удельная активность трития в среде на единицу массы, т. е. число распадов трития в секунду на грамм массы воды (Бк/г),  $\eta$  – коэффициент содержания воды в клетке. Значения коэффициента  $\eta$  существенно варьируются в экспериментах – от 0,7 до 0,9 для разных типов клеток и от 0,9 до 1,05 в случае лейкоцитов [93]. Считается, что значение  $\eta=0,8$  годится для дозиметрии бета-лучей от НТО в культивируемых клетках млекопитающих [48].

При определении мощности дозы от  $^3\text{H}$ -аминокислот и  $^3\text{H}$ -нуклеозидов приходится учитывать неоднородность концентрации трития в среде и клетке. Известно, что  $^3\text{H}$ -аминокислоты включаются в состав белков ядра и клетки, а  $^3\text{H}$ -нуклеозиды активно включаются преимущественно в состав ДНК только ядра. В соответствии с общепринятыми представлениями, большинство токсичных биологических эффектов от радиации обусловлено нарушениями структуры ДНК ядра клетки, поэтому логично выбрать в качестве целевого объема – объем клеточного ядра. При малой активности тритиевой воды НТО за относительно короткие промежутки времени (сравнимые со временем репарации разрывов ДНК) не во всех клетках происходит распад трития, поэтому однородность распределения радиации нарушается и формула (3) уже не корректна, поэтому в оценках дозиметрии НТО также необходимо учитывать целевой объем ядра клетки. Для учета целевого фактора облучения значения дозы в формуле (3) нужно разделить на соответствующую массу цели (ядра или клетки) выраженную в граммах.

$$D = 9,12 \cdot 10^{-13} \cdot N \cdot \mu / m \text{ (Гр)}, \quad (4)$$

где  $N$  – число распадов трития в целевом объеме за время облучения,  $m$  – масса ядра (или клетки) в граммах,  $\mu$  – поправочный коэффициент краевого эффекта излучения.

Принимается, что масса целевого объема при оценке дозы от  ${}^3\text{H}$ -аминокислот равна массе клетки, а от  ${}^3\text{H}$ -нуклеозидов массе ядра [1, 27, 42, 47, 49].

Поскольку часть энергии распада выделяется за пределами целевого объема, который содержит весь материал мишени, то расчетная доза, полученная целевым объемом, уменьшается. Этот фактор учитывается поправочным коэффициентом краевого эффекта излучения  $\mu$ , который в случае нахождения источника излучения в ядре часто считается равным 0,8, т.е. предполагается, что 20% энергии бета-излучения трития выделяется вне ядра клетки.

Приведенные формулы основаны на предположении, что концентрацию энергии трития в веществе можно количественно корректно определить через среднюю энергию излучения. Но при распаде трития, энергия распределяется между бета-частицей и антинейтрином случайным образом, поэтому соответствующее электронное излучение имеет спектральное распределение, которое определяет вероятность (частоту) излучения электрона определенной энергии. Нами предлагается использовать более общую методику дозиметрии трития, учитывающую спектральный энергетический состав при распаде трития и основанную на полуаналитических методах расчета доли энергии электронов поглощаемой в целевой области.

Общее уравнение для поглощенной дозы при излучении моноэнергетического электрона можно представить в следующей форме:

$$D_{V_T} = A_S S(V_T \leftarrow V_S) \quad (5)$$

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \frac{k E \phi(V_T \leftarrow V_S)}{m_T} \quad (6)$$

Множитель  $S$  (S-значение) – часть энергии  $E$ , освобождаемой (испускаемой) при единичном радиоактивном распаде в области источника, которая поглощается в области мишени, нормализованная на массу области мишени. Здесь  $k$  – коэффициент пропорциональности, определяющий размерность величин,  $E$  – энергия электрона,  $m_T$  – масса целевой области,  $\phi(V_T \leftarrow V_S)$  – доля энергии излучаемой из области источника  $V_S$ , которая поглощается в целевой области  $V_T$ ,

$A_S$  – накопленная активность (число распадов изотопа) в области источника за определенное время.

Для простой геометрии данные, полученные для моноэнергетических электронов, могут быть интегрированы с учетом спектра излучения радионуклида, что позволяет уже найти поглощенную долю энергии от распада радионуклида на заданном расстоянии от точечного источника.

Соответствующий спектр трития представлен на рисунке 1. Для указанного приближения электронного спектра трития средняя кинетическая энергия составляет 5,685 кэВ, что с точностью до 0,1% соответствует экспериментальным значениям.

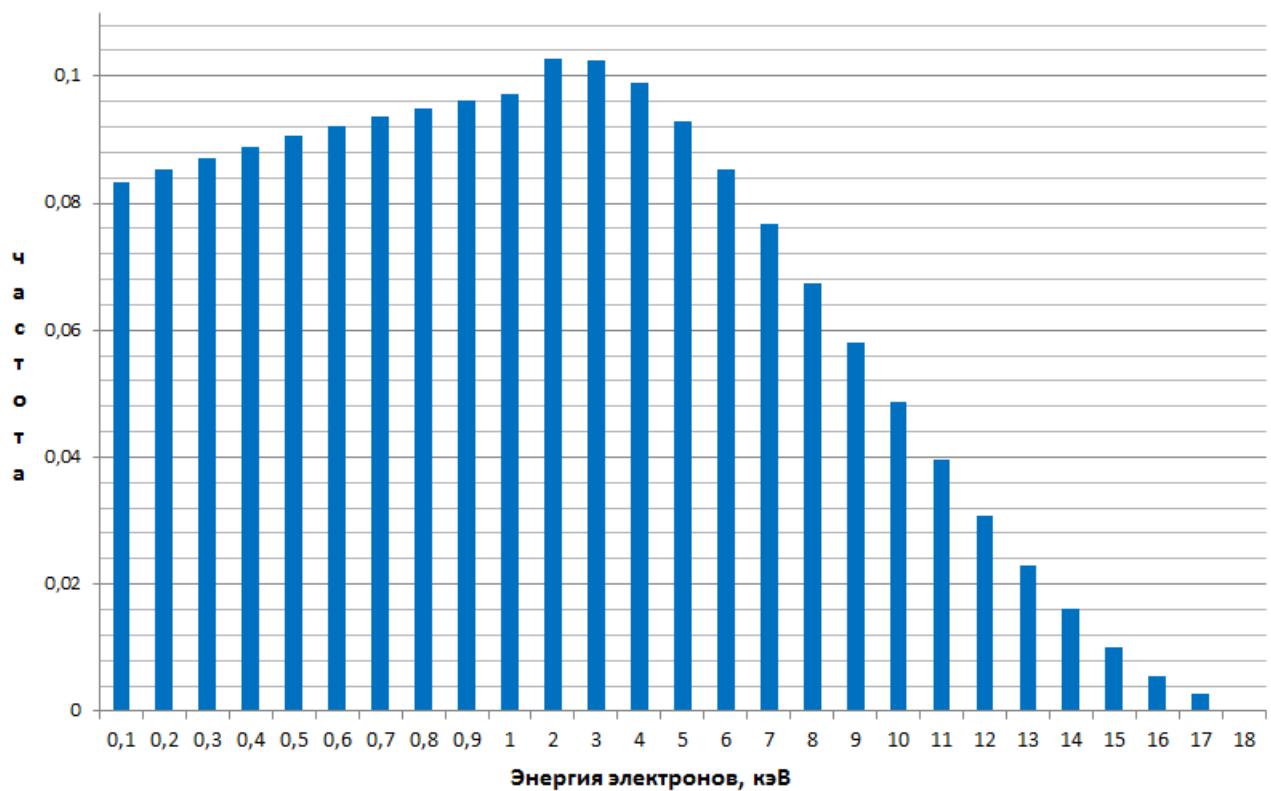


Рисунок 1 – Аппроксимации бета-спектра трития по данным базы данных радионуклидов Radiological Toolbox версии 3.0.0  
(источник: <https://www.ornl.gov/crpk/software>)

Вследствие случайного характера появления электронов той или иной энергии ( $E$ ), их воздействие является независимым друг от друга. Для трития параметры, характеризующие это воздействие моноэнергетических электронов, просто суммируются с учетом частоты распределения энергии электронов в его

спектре. Таким образом, если известны значения параметров (например, S-значений) моноэнергетических электронов, процедурой взвешивания этих значений можно определить соответствующий параметр у трития. Взвешивание (осреднение) проводится в соответствии с вероятностью ( $P$ ) появления электрона определенной энергии ( $\int P dE = 1$ ).

$$S = \frac{\int_0^{\infty} P(E)E S(E) dE}{\int_0^{\infty} P(E)E dE} \quad (7)$$

Микродозиметрические расчеты параметров низкоэнергетических электронов [97, 98, 99] показали, что учитывать бета-распределение трития в диапазоне энергий 0,1-1 кэВ следует в случае очень малых масштабов (2-50 нм). В масштабах выше 0,1 мкм достаточно рассматривать бета-распределение трития от 1 до 18 кэВ.

В соответствии с принятой аппроксимацией спектра трития соотношение для расчета S-значения с целевой областью в объеме ядра или клетки принимает вид:

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \frac{k}{m_{r_T}} \cdot \sum_{j=1}^{18} P_j E_j \phi_j(r_T \leftarrow r_S) \Delta E = \sum_{j=1}^{18} P_j S_j(r_T \leftarrow r_S) \Delta E, \quad (8)$$

где  $P_j$  и  $E_j$  – частота (вероятность) и энергия соответствующего диапазона спектра,  $\Delta E$  – шаг по энергетическому диапазону спектра равный 1 кэВ,  $\phi_j$  – доля энергии излучаемой из области источника, который поглощается в целевой области для  $j$ -го компонента излучения спектра трития,  $S_j(r_T \leftarrow r_S)$  – S-значение для электронов с энергией  $E_j$ .

В [100] проведен анализ различных методов для расчета доз от трития на клеточном уровне, в результате которого предложено использовать метод Комитета по дозам внутреннего медицинского облучения Общества ядерной медицины (Medical Internal Radiation Dose – MIRD) для расчета S-значений (средняя поглощенная доза в области мишени на единицу активности). Этот метод имеет два основных ограничения: использование приближения непрерывного замедления и предположение о сферической геометрии мишени.

Для простой геометрии, данные, полученные для моноэнергетических выбросов частиц, могут быть интегрированы в спектр излучения радионуклида.

## 2.2 Методика дозиметрии трития на клеточном уровне

### 2.2.1 Метод расчета S-значений электронов низкой энергии

На основе работ [101, 102], комитет MIRD принял достаточно простой детерминированный подход для вычисления клеточных S-значений с использованием аналитической формулы дальности и энергии и приближения непрерывного замедления CSDA (continuous-slowing-down-approximation) [97]. В формализме MIRD поглощенная доля  $\phi$  записывается в виде следующего интеграла свертки:

$$\phi(r_T \leftarrow r_S) = \frac{1}{E} \int_0^{\infty} \psi_{r_T \leftarrow r_S}(x) \frac{dE}{dX} \Big|_{R(E) - x} dx, \quad (9)$$

где  $\psi_{r_T \leftarrow r_S}$  – является геометрическим коэффициентом,  $\frac{dE}{dX} \Big|_{R(E) - x}$  – тормозная способность, с подстановкой  $X \equiv R(E) - x$  (остаточный пробег частицы с начальной энергией  $E$  после прохождения расстояния  $x$  в среде),  $R(E)$  – диапазон CSDA частиц, определяемый как толщина поглотителя, задерживающего 95% падающих частиц (т.е. при уровне пропускания 5%).

Для электронов с энергией от 20 эВ до 20 МэВ используются формулы, полученные на основе экспериментов по передаче электронов в воздухе и пластиковой фольге, называемые еще тормозной способностью Коула [103]:

$$\begin{cases} E = 5,9(X + 0,007)^{0,565} + 0,00413X^{1,33} - 0,367 \\ \frac{dE}{dX} = 3,333(X + 0,007)^{-0,435} + 0,0055X^{0,33} \end{cases} \quad (10)$$

Единицы в уравнении (10):  $E$  в кэВ,  $X$  в 100 мкг/см<sup>2</sup> (или микрон при единице плотности) и  $dE/dX$  в кэВ·см<sup>2</sup> / 100/мкг (эквивалент кэВ/мкм при единице плотности).

Совокупность соотношений (6), (9), (10) позволяет сделать относительно простой расчет дозиметрии радионуклидов на клеточном уровне, если известны размеры сферической формы клеток.

## 2.2.2 Геометрический фактор

Аналитическое представление геометрического фактора (геометрических коэффициентов)  $\psi_{r_T \leftarrow r_S}(x)$  возможно в случае сферической симметрии мишени. Поэтому для оценки средней дозы облучения, доставляемой ядру клетки за счет эмиссии электронов, используется сферическое представление распределения источников: полная сфера для радиоактивности, распределенной внутри ядра ( $N$ ), пустая центральная сфера, окруженная сферической оболочкой, имитирующей цитоплазматическое ( $Cy$ ) распределение (рисунок 2).

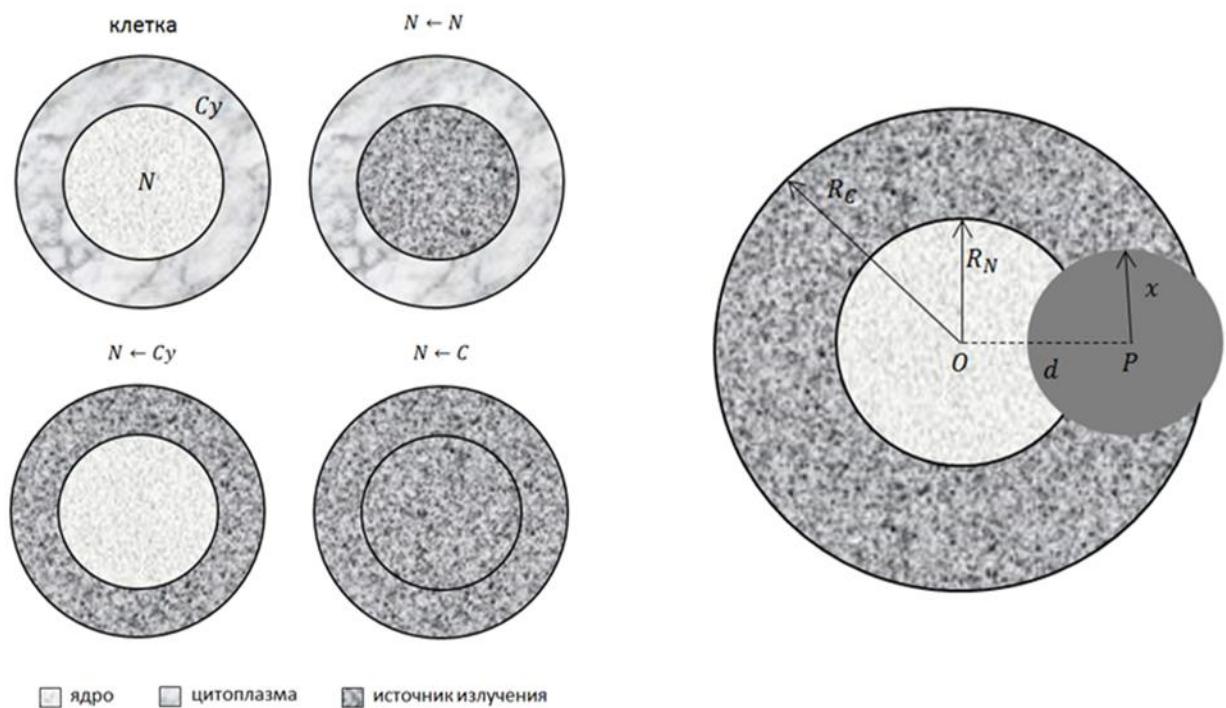


Рисунок 2 – Изображение расположений источника излучения и сферическая геометрия клетки с источником излучения в цитоплазме:  $R_N$  – радиус ядра,  $R_C$  – радиус клетки,  $x$  – радиус области распространения излучения

Для каждого значения  $x$  и каждого точечного источника  $P$  на расстоянии  $d$  от центра клетки вычисляется доля  $\psi_{r_T \leftarrow r_S}(x)$  сферической оболочки с центром в точке  $P$  (радиус  $x$ ), которая способна передать часть излучаемой энергии внутри клетки в ее ядро.

Ядро клетки, в которой содержится ДНК, считается областью-мишенью. Аналитическое решение возможно в случае сферической симметрии ядро-ядро

$(N \leftarrow N)$  и цитоплазма-ядро  $(N \leftarrow Cy)$ . Для варианта клетка-ядро  $(N \leftarrow C)$  для вычисления S-значения можно использовать следующее соотношение:

$$S_{N \leftarrow C} = \frac{S_{N \leftarrow N} V_N + S_{N \leftarrow Cy} V_{Cy}}{V_C}, \quad (11)$$

где  $V_N$ ,  $V_{Cy}$  и  $V_C$  объемы ядра, цитоплазмы и клетки соответственно.

В работе [104] рассмотрен также вариант облучения соседних клеток, но в случае трития вариант клетка-клетка не актуален из-за короткого пробега бета-частиц.

Метод и формулы расчета геометрического фактора  $\psi_{r \leftarrow r_s}(x)$  в случае сферической геометрии ядро-ядро  $(N \leftarrow N)$  и цитоплазма-ядро  $(N \leftarrow Cy)$  подробно представлены в нескольких источниках литературы [101, 102, 105].

Для распределения в ядре клетки  $\psi_{N \leftarrow N}(x)$ :

$$\psi_{N \leftarrow N}(x) = \begin{cases} 1 - \frac{3}{4} \left( \frac{x}{R_N} \right) + \frac{1}{16} \left( \frac{x}{R_N} \right)^3, & \text{при } 0 \leq x \leq 2R_N \\ 0, & \text{при } x > 0 \end{cases}$$

Для распределения в цитоплазме клетки  $\psi_{N \leftarrow Cy}(x)$ , если  $R_C \leq 3R_N$ :

$$\psi_{N \leftarrow Cy}(x) = \begin{cases} \frac{3}{4x(R_C^3 - R_N^3)}, & \text{при } 0 \leq x \leq R_C - R_N \\ Q \left[ \frac{1}{2} (R_C^2 - R_N^2) (R_N^2 - x^2) + \frac{2x}{3} (R_C^3 - R_N^3) - \frac{1}{4} (R_C^4 - R_N^4) \right], & \text{при } R_C - R_N \leq x \leq 2R_N \\ \frac{Q}{12} \left[ x^4 - 3(R_C^4 + R_N^4) + 6 \frac{1}{4} (R_C^2 R_N^2 - x^2 R_N^2 - x^2 R_C^2) + 8x (R_C^3 + R_N^3) \right], & \text{при } 2R_N \leq x \leq R_C + R_N \\ 0, & \text{при } x > R_C + R_N \end{cases}$$

### 2.2.3 Определение диапазона пробега электрона низкой энергии

В формулах расчета S-значения присутствует величина  $R$  – диапазон пробега электрона в биологической ткани. Без потери точности итоговых расчетов доз плотность можно принять равной плотности воды 1 г/см<sup>2</sup>. Принимается приближение непрерывного замедления и пробег электрона равен длине его пути. Значения диапазона CSDA рассматривается как максимальный пробег в одном направлении (с уменьшением начальной кинетической энергии до

тепловой энергии), за исключением 5% электронов с наибольшим пробегом. В работе [100] представлены значения диапазона CSDA (в мкм) в воде для электронов с энергией от 1 до 18 кэВ из различных источников литературы и обоснован выбор оптимальных значений диапазона CSDA для наших расчетов.

Общая аналитическая формула для длины пути и глубины проникновения электронов низких энергий (0,1-10 кэВ), на основе расчетов методом Монте-Карло, принята из работы [98].

$$R = a(b + cE)^d$$

для глубины проникновения:

$$a = 8,421 \cdot 10^{-6}, b = 1738, c = 5036, d = 1,801 \quad (12)$$

для длины пути:

$$a = 7,511 \cdot 10^{-6}, b = 800,1, c = 4702, d = 1,783$$

При энергиях электронов от 10 до 18 кэВ для длины пути можно использовать экспоненциальную зависимость из [106].

$$R = 0,048 \cdot E^{1,723} \quad (13)$$

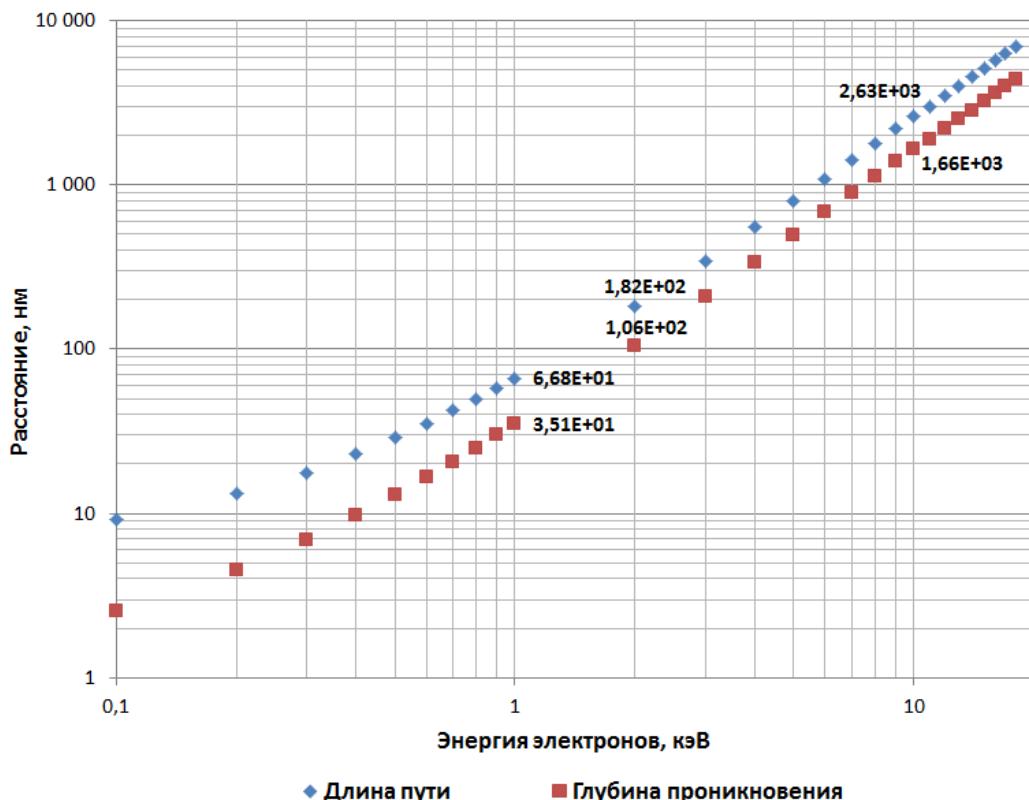


Рисунок 3 – Длина пути и глубина проникновения электронов с энергией от 0,1 до 18 кэВ (логарифмический масштаб)

На рисунке 3 представлена зависимость длины пути и глубины проникновения электронов от их энергии в соответствии с энергетическим спектром трития.

#### 2.2.4 Расчет S-значений низкоэнергетических электронов и трития

В целях верификации собственных расчетов по изложенной методике, за эталон принимается сферическая модель клетки с размерами ядра  $R_N = 4$  мкм и клетки  $R_C = 5$  мкм. Выбор этих размеров обусловлен сравнением собственных расчетов со значениями величин из [3, 97, 107, 108] для таких же клеток.

Целью считалось ядро клетки. Расчеты S-значений проводились для следующих вариантов распределения источника и цели: ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ), цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ) и клетка-ядро ( $N \leftarrow C$ ). Выбор этих вариантов связан с общей убежденностью, что возникновение токсических эффектов обусловлено воздействием радиации на ядро клетки, и тем, что  $^3\text{H}$ -нуклеозиды концентрируются только в ДНК ядра клетки, а  $^3\text{H}$ -аминокислоты в белках во всем объеме клетки. Кроме того, экспериментальные исследования показали однородность распределения соединений трития, соответственно  $^3\text{H}$ -нуклеозидов в ядре и  $^3\text{H}$ -аминокислот в клетке, что является существенным фактором при использовании формализма MIRD. Тритиевая вода (НТО и  $^3\text{H}_2\text{O}$ ) равномерно распределяется по всей среде и клетке, и в связи с малой глубиной проникновения бета-частиц трития, вариант клетка-ядро ( $N \leftarrow C$ ) можно использовать для оценки S-значений НТО.

Нами были проведены расчеты S-значений электронов с энергией от 1 до 18 кэВ для вариантов ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ), цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ) и клетка-ядро ( $N \leftarrow C$ ), со значениями диапазона CSDA из различных литературных источников. На основе этих расчетов за оптимальные значения диапазона CSDA были приняты величины, рассчитанные по формуле (12) при энергиях электрона  $E$  от 1 до 10 кэВ и по экспоненциальной зависимости (13) при энергиях электрона  $E$  от 1 до 18 кэВ.

Сравнение собственных расчетов по модифицированному методу MIRD (S-значений электронов с энергией от 1 до 18 кэВ) с расчетами по классическому представлению метода MIRD [97] и с численными расчетами методом Монте-Карло [107, 108] представлено на рисунках 4 и 5 для вариантов ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) и цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ).

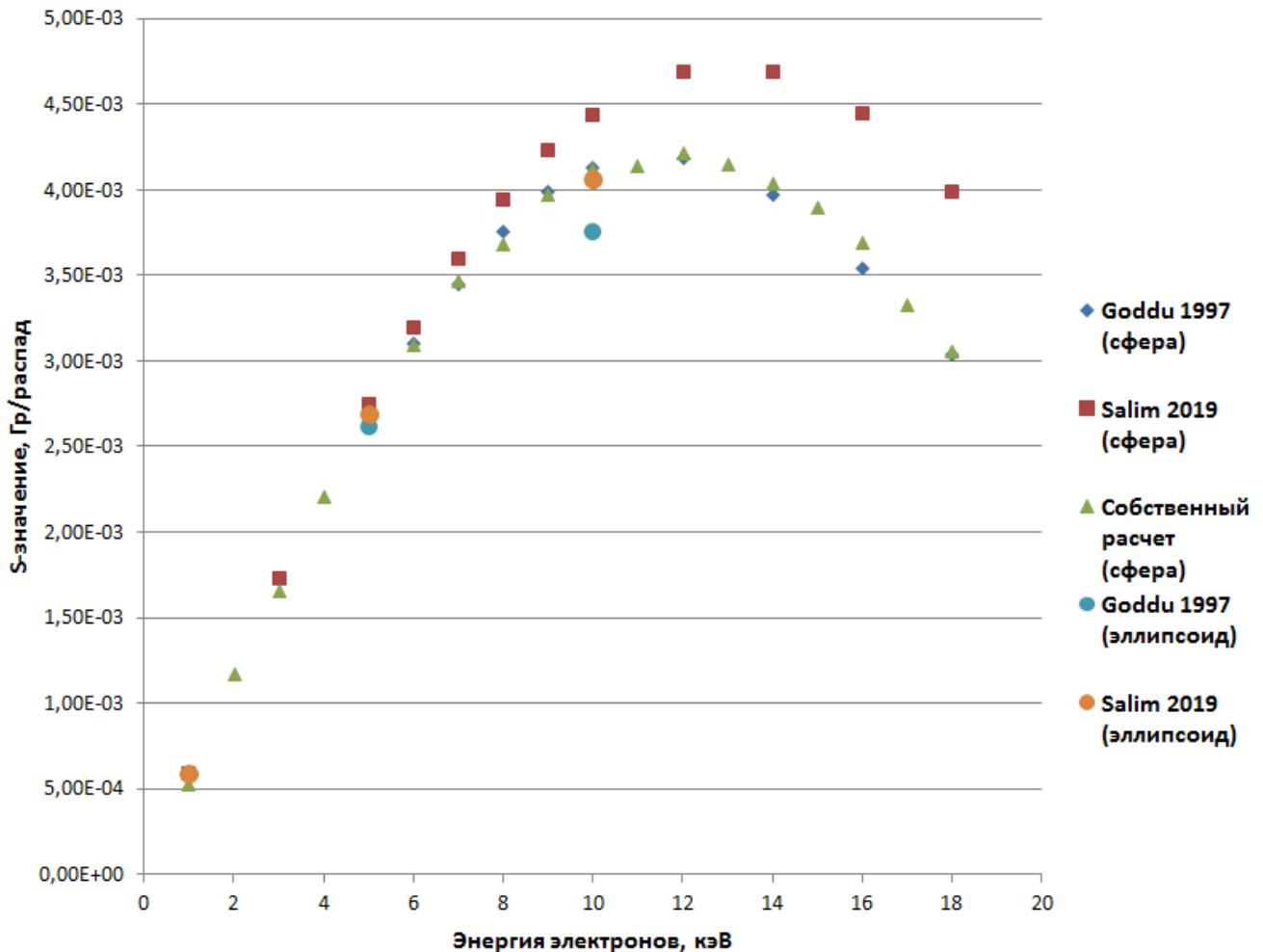


Рисунок 4 – Сравнение S-значений ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) для сферической ( $R_N = 4$ ,  $R_C = 5$ ) и эллипсоидальной модели (полуоси ядра 8, 4, 2 и клетки 10, 5, 2,5 мкм)

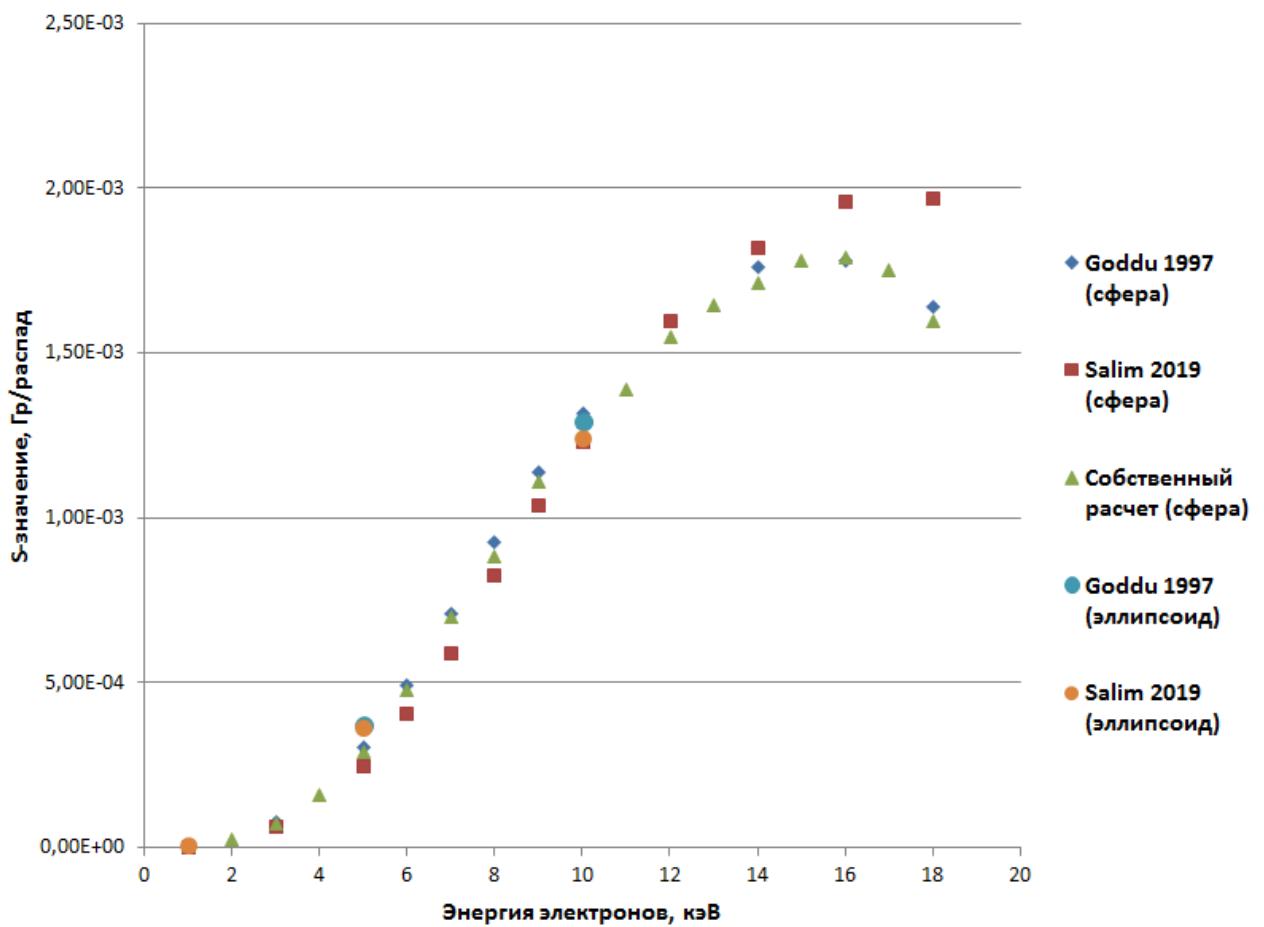


Рисунок 5 – Сравнение S-значений цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ) для сферической ( $R_N = 4$ ,  $R_C = 5$ ) и эллипсоидальной модели (полуоси ядра 8, 4, 2 и клетки 10, 5, 2,5 мкм)

С целью определения S-значений для трития использовалось взвешивание (осреднение) по энергетическому спектру трития в соответствие с формулой (8) S-значений моноэнергетических электронов с энергиями от 1 до 18 кэВ.

Расчеты для трития различными методами в сферической геометрии клетки ( $R_N=4$  мкм и  $R_C=5$  мкм) представлены на рисунке 6. Расчеты S-значений (Гр/распад) выполнены с учетом геометрического фактора для излучения ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) и цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ). Также выполнен расчет по формуле для средней энергии трития (4).

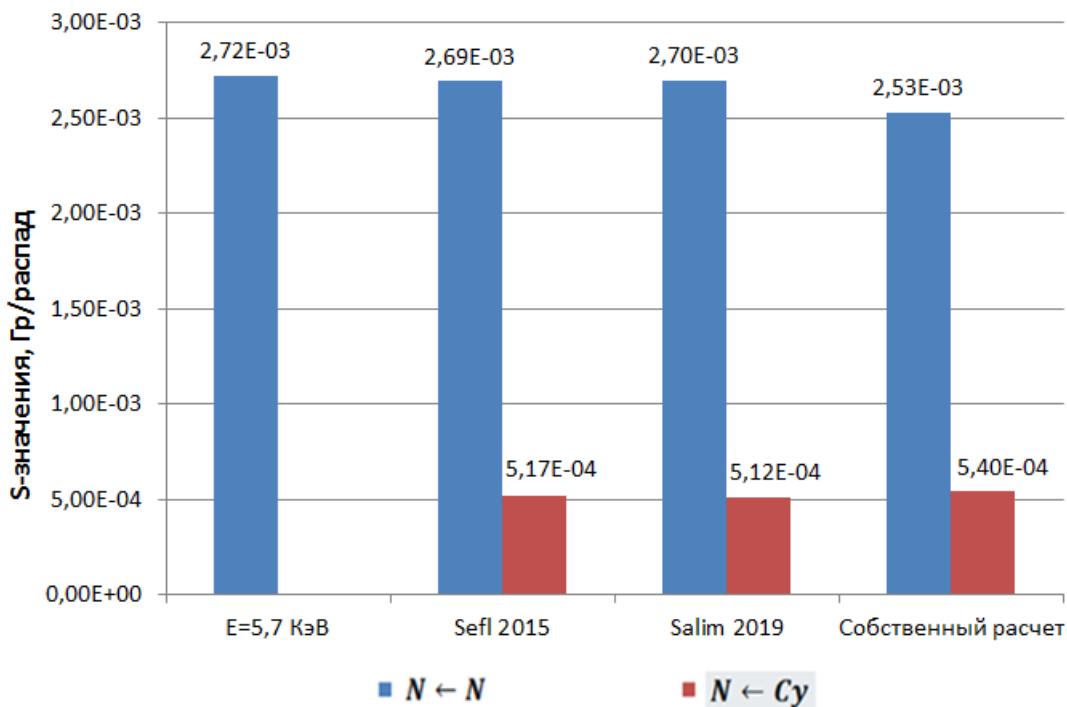


Рисунок 6 – Сравнение S-значений для трития ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) и цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ) в сферической геометрии клетки ( $R_N = 4$ ,  $R_C = 5$ ) при использовании различных методов расчета

В целях верификации собственных расчетов проведено также сравнение с расчетами методом Монте-Карло S-значения  $6,08 \cdot 10^{-4}$  Гр на распад трития для случая клетка-ядро ( $N \leftarrow C$ ) сферической модели клетки V79 с размерами  $R_N = 5,2$ ,  $R_C = 7,1$  [106]. Соответствующий собственный расчет дает значения для сферической модели клетки V79  $5,77 \cdot 10^{-4}$  Гр на распад трития и, следовательно, отличие полученных значений составляет 5,4%.

В таблице 1 сравниваются S-значения для случаев ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ), полученные методом средней энергии по формуле (4) и собственным расчетом при различных размерах ядра клетки. При малых размерах ядра расчетные значения существенно различаются, при средних размерах значения близки друг другу, а при росте размера ядра отличие тоже растет.

Таблица 1 – S-значения трития (Гр/распад) для случаев ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ), полученные методом средней энергии и собственным расчетом при различных размерах ядра клетки

Метод расчета	Радиус ядра клетки, мкм					
	2	3	4	5	6	7
Метод ср. энергии (5,7 кэВ)	2,18E-02	6,45E-03	2,72E-03	1,39E-03	8,07E-03	5,08E-04
Собственный расчет	1,56E-02	5,50E-03	2,54E-03	1,38E-03	8,25E-04	5,33E-04
Отличие, %	39,5%	17,3%	7,1%	1,4%	-2,2%	-4,7%

В таблице 2 представлен собственный расчет S-значений трития для разных размеров сферической модели клетки: по вертикали радиус ядра и по горизонтали радиус клетки. Верхнее число в ячейке таблицы – S-значение ядро-ядро, нижнее – S-значение цитоплазма-ядро.

Таблица 2 – S-значения трития (Гр/распад) ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) и цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ), для разных размеров сферической модели клетки (собственный расчет)

Радиус ядра, мкм	Радиус клетки, мкм						
	3	4	5	6	7	8	9
2	1,56E-02	1,56E-02	1,56E-02	1,56E-02			
	2,80E-03	1,29E-03	6,72E-04	3,82E-04			
3		2,95E-03	1,63E-03	9,67E-04	6,15E-04	4,13E-04	2,90E-04
		1,09E-03	5,59E-04	3,20E-04	1,97E-04	1,29E-04	8,95E-05
4			2,54E-03	2,54E-03	2,54E-03	2,54E-03	2,54E-03
			5,26E-04	2,82E-04	1,68E-04	1,08E-04	7,30E-05
5				1,38E-03	1,38E-03	1,38E-03	1,38E-03
				2,90E-04	1,61E-04	9,86E-05	6,48E-05

## Продолжение таблицы 2

		Радиус клетки, мкм						
		3	4	5	6	7	8	9
6						8,25E-04	8,25E-04	8,25E-04
						1,77E-04	9,98E-05	6,26E-05
7							5,33E-04	5,33E-04
							1,15E-04	6,62E-05

## 2.2.5 Особенности влияния расстояния от ядра и геометрии клетки

Глубина проникновения электронов энергетического диапазона трития позволяет оценить максимальное расстояние от границы ядра клетки в цитоплазме, за пределом которого энергия от распада бета-излучения трития будет незначительной при поступлении в ядро клетки. Максимальная толщина цитоплазматической оболочки вокруг ядра может быть принята в 2 мкм. Это обусловлено тем, что при энергии электрона в 10 кэВ глубина его проникновения составляет примерно 1,7 мкм (рисунок 3) и с расстоянием большим 2 мкм в ядро попадут только электроны с энергией выше 11 кэВ. Вероятность появления электронов выше 11 кэВ при распаде трития низкая (меньше 0,03), кроме того, подавляющая часть их энергии при распаде в цитоплазме не попадает в ядро из-за произвольности направления излучения при распаде изотопа. Считается, что воздействием бета-распада трития на ядро клетки на расстояниях в цитоплазме больших 2 мкм от ядра можно пренебречь.

Геометрия клетки может влиять на среднюю поглощенную дозу в ядре и, таким образом, на биологический эффект. Учитывая, что многие клетки имеют сложную форму, доза в ядре может быть завышена или занижена в предположении сферической формы ядра и клетки. Поглощенные доли энергии для несферических тел всегда меньше, чем для сфер такой же массы [109], а поглощённые фракции энергии внутреннего излучения одинаковы для эллипсоида и сферы, имеющей такое же отношение «объём/поверхность» как у исходного эллипса [110].

В некоторых работах, на основе компьютерного моделирования взаимодействия ионизирующего излучения с веществом, сравниваются S-значения моноэнергетических электронов при сферической и эллипсоидальной формах ядер и клеток [107, 108, 111]. У эллипсоидной (отношение осей 0,5 и 0,25 к наибольшей оси) и сферической геометрий эталонных клеток равной массы (рисунок 4, 5), S-значения различаются в пределах  $\sim 5\%$ , (источник и мишень расположены в ядре) и  $\sim 10\%$  (источник расположен в цитоплазме).

Если оценить те же отношения S-значений учитывая энергетический спектр трития, то для случая ядро-ядро ( $N \leftarrow N$ ) отношение ( $S_{ellipsoid}/S_{sphere}$ ) составит 0,956, т.е. относительная погрешность будет 4,4%, а для случая цитоплазма-ядро ( $N \leftarrow Cy$ ) аналогичное отношение составит 1,11 с относительной погрешностью в 10,9%.

Это заключение согласуется с расчетами, проведенными для трития в [112], где показано, что уменьшение дозы из-за вариации геометрических факторов (сфера – эллипсоид) находится в пределах 5% для большинства клеток тканей органов, и основным определяющим параметром для расчета дозы в ДНК является средний диаметра ядра клетки.

Следовательно, расчет дозы для трития по предлагаемой нами методике в предположении о сферической симметрии клетки меньше расчета дозы с использованием современных численных методов Монте-Карло ( $\sim 5\%$ ), но так как реальные клетки представляют собой эллипсоиды, S-значения которых меньше ( $\sim 5\%$ ), чем S-значения у сферы среднего диаметра, то предлагаемый расчет будет оптимальным для реальных клеток.

Представленная методика дозиметрии трития имеет простую программную реализацию и позволяет быстро оценить дозу, полученную ядром клетки при различном распределении трития в клетке, с хорошей точностью при размерах ядра клетки более 1 мкм. Метод считается корректным для электронов с энергией выше 400 эВ [96].

На уровнях ниже 1 мкм для низкоэнергетических электронов некорректно использование эффективной тормозной способности Коула, диапазона CSDA и

геометрических коэффициентов, которые использовались при расчете на уровне клетки. Поэтому в случае размеров субклеточной мишени менее 1 мкм вплоть до молекулярного уровня необходимо применение численных расчетов методом Монте-Карло и математических моделей микродозиметрии.

### 2.3 Активность трития на клеточном уровне

В предыдущем разделе изложена методика определения значения полученной дозы ядром клетки (S-значения) при одном распаде случайно распределенного трития внутри ядра или в цитоплазме. Чтобы рассчитать полученную ядром дозу необходимо еще знать количество распадов трития в ядре и клетке при известной активности трития в окружающей клетки среде. Количество распадов трития зависит от соединения с тритием (HTO, OCT), удельной активности среды, размеров ядра и клетки, параметров клеточного цикла, молекулярного состава нуклеозидов и белков в клетке. В экспериментах *in vivo* в клетках органов млекопитающих принимаются во внимание дополнительные параметры определяющие кинетику и метаболизм соединений с тритием в организме.

#### 2.3.1 Распределение молекулярных соединений с тритием в клетках

Степень клеточного повреждения зависит от того, где молекулы встроены в клетку, и достаточно ли долго в ней находится, чтобы атом трития распался. Вода, содержащая тритий, быстро диффундирует по всем клеточным мембранам и быстро уравновешивается с жидкостями организма, достигая однородной концентрации в клетках. Только часть молекул OCT легко проникают через клеточную и ядерную мембранны. Это относительно небольшие молекулы – предшественники белков (аминокислоты) и непосредственные предшественники нуклеиновых кислот. Специфическая локализация источника и малый диапазон бета-частиц трития может приводить к неоднородному распределению поглощенной дозы между ядром и цитоплазмой клетки.

В клетках эукариот вода составляет 75-85%, белки 10-20%, нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) 1-2%. ДНК (массой ~6 пикограмм) находится в ядре клетки

в составе хромосом (99%), три вида РНК (общей массой ~10-30 пикограмм) содержатся в ядре и цитоплазме. Большая часть РНК в ядре локализована в ядрышке, но также находится в хроматине и в кариоплазме, в цитоплазме рРНК служат структурной и катализической основой рибосом.

Аминокислоты с белками распределены по всей клетке. Ряд исследований показывает, что меченные тритием аминокислоты и НТО гомогенно распределяются внутри клетки [47, 45]. Большинство белков синтезируются во все время всего клеточного цикла, а структурные белки хроматина в стадии синтеза (S-фаза). Нуклеозиды включаются в ДНК только во время S-фазы клеточного цикла, а в РНК на протяжении большей части клеточного цикла.

Эффект распределения трития, включенного в хроматин, приводит к селективному облучению ядра клетки, поэтому его биологическое воздействие может быть больше, чем у трития, равномерно распределенного во всем объеме клетки. В хроматине будут присутствовать предшественники ДНК и структурные гистоновые и негистоновые белки. Можно ожидать, что будет наблюдаться большее количество разрывов ДНК в клетках, культивированных *in vitro* в культурах содержащих  $^3\text{H}$ -тимидин по сравнению с  $^3\text{H}$ -аминокислотами при их эквимолярном количестве. При этом должно наблюдаться большее число разрывов ДНК для тритированных аминокислот с большим содержанием в белках хроматина.

При эквимолярном числе  $^3\text{H}$ -нуклеозидов в культуральной среде,  $^3\text{H}$ -тимидин будет включаться в большем количестве в ДНК, так как другие  $^3\text{H}$ -нуклеозиды включаются также в РНК и распределены не только в ядре, но и цитоплазме клетки. Биологический эффект воздействия  $^3\text{H}$ -тимицина на повреждения ДНК считается максимальным по отношению к другим  $^3\text{H}$ -нуклеозидам [1].

### 2.3.2 Оценка количества распадов трития в ядрах и клетках *in vitro*

Количество распадов трития в ядре и клетке можно определить, проводя экспериментальные измерения удельной радиоактивности трития в клетках, ядрах

и ДНК. Радиоактивность измеряется в суспензиях клеток, ядер и растворах ДНК, при этом в жидкостном сцинтилляционном счетчике измеряется количество распадов трития в единицу времени на известное число клеток. Обычно, измерения удельной активности происходит в конце периода инкубации ( $A_T$ ) в культуральной среде с тритированными соединениями. В период времени  $t$  от 0 до  $T$  функциональные зависимости активности трития в клетке от времени  $A(t)$  у НТО и соединений ОСТ разные.

Предполагается, что НТО быстро распределяется по всему объему культуральной среды и клеткам, вследствие этого, его активность постоянна в течение клеточного цикла. В зависимости от вида, ОСТ последовательно встраивается в ядра, цитоплазму и ДНК в различных фазах клеточного цикла. Исследования воздействия  $^3\text{H}$ -тимицина и  $^3\text{H}$ -аминокислот на клетки [25, 47, 113, 114] показывают, что при постоянной активности в культуральной среде активность ОСТ в клетках линейно возрастает в течение 24 ч, а с увеличением объемной активности в культуральной среде рост активности ОСТ в клетках тоже имеет линейный характер. В последующие периоды при постоянной инкубации с тритием возникает эффект насыщения и активность ОСТ в клетках выходит на стабильный уровень. У большинства клеток эукариот период клеточного цикла от 24 ч и выше, поэтому обычно измерения клеточных откликов на облучение проводятся после периода инкубации с тритием в 24 часа.

Общая формула для расчета количества распадов ( $N$ ) трития в период времени  $t$  от 0 до  $T$  следующая:

$$N = \int_0^T A(t)R(T-t) dt, \quad (14)$$

где  $A(t)$  – функция активности от времени ( $A(t) = A_T = \text{const}$  у НТО,  $A(t) = \frac{A_T}{T}t$  у ОСТ),  $R(t)$  – функция учета восстановления клеточного отклика от радиации,  $A_T$  – экспериментальное измерение активности в соответствующих структурах клетки,  $T$  – период облучения (инкубации с изотопом).

Наглядное представление расчета по формуле (14) представлено на рисунке 7. Учет восстановления клеточного отклика заключается в определении только числа распадов  $N$  в конечный промежуток времени перед завершением инкубации с соединениями трития, так как предыдущие распады трития существенно не влияют на измерения клеточного эффекта в конце периода инкубации. Величина клеточного эффекта будет определяться «остаточной дозой», т.е. поглощенной дозой ядром клетки за один распад (S-значение) умноженной на число распадов трития в ядре и цитоплазме клетки с учетом функции восстановления клеточного отклика.

#### Радиоактивность

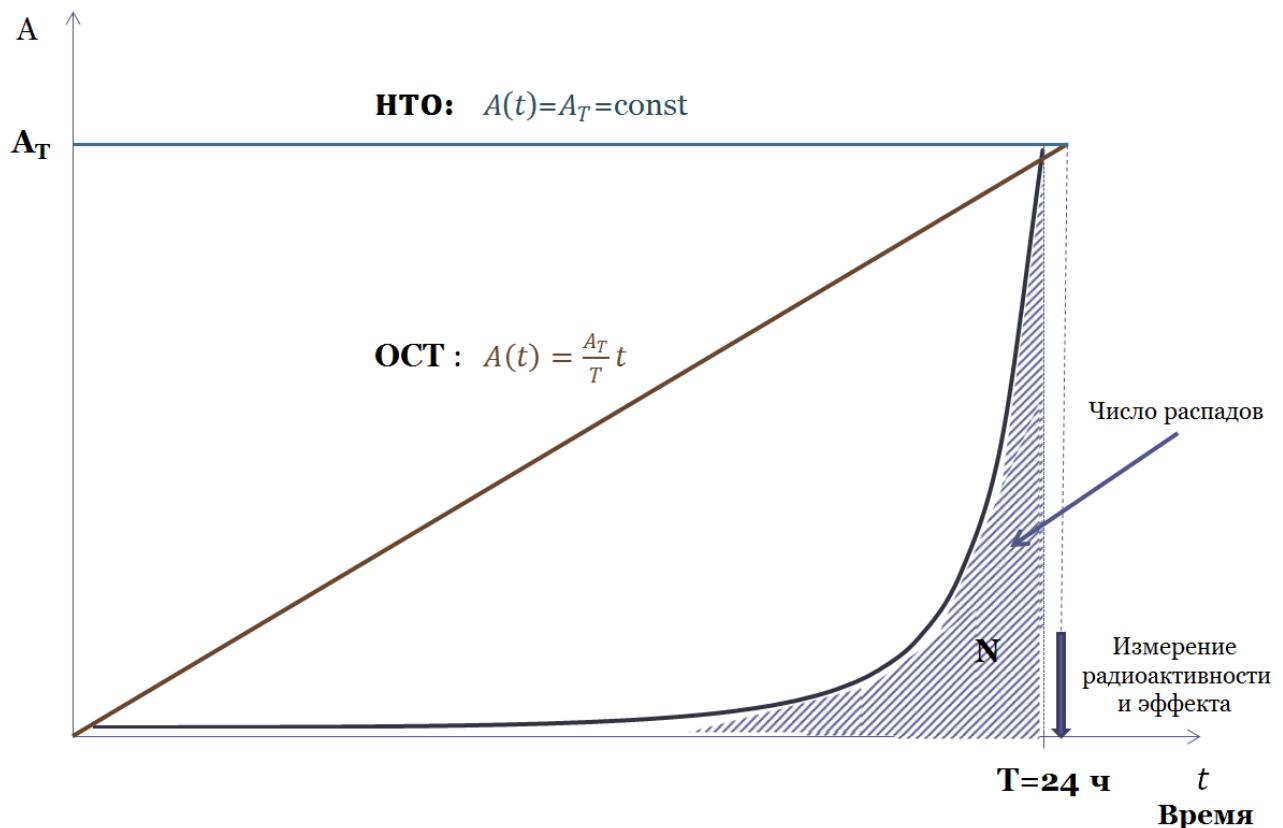


Рисунок 7 – Определение числа распадов ( $N$ ) трития НТО и ОСТ с учетом функции восстановления клеточного отклика

В случае исследования количества разрывов ДНК от воздействия облучения, функция  $R(t)$  может быть аппроксимирована двумя экспоненциальными зависимостями, отражающими быстрый и медленный процесс репарации ДР ДНК.

Подавляющая часть ДР ДНК от распада трития полностью восстанавливается с определенной зависимостью от времени. Процесс репарации ДР ДНК и динамика фокусов белков-маркеров от ионизирующего излучения исследовались в ряде работ [115-118]. Принимая во внимание данные из этих работ по репарации ДР ДНК можно аппроксимировать процесс снижения количества ДР ДНК двумя экспоненциальными зависимостями (рисунок 8):  $a e^{-b(T-t)}$ , где  $T$  – период времени действия излучения (24 ч),  $t$  – текущий момент времени (от 0 до  $T$  в ч),  $\theta$  – время смены параметров экспоненты (2,2 ч),  $a_1 = 1,08$ ,  $b_1 = 0,81$ ,  $a_2 = 0,34$ ,  $b_2 = 0,24$ .

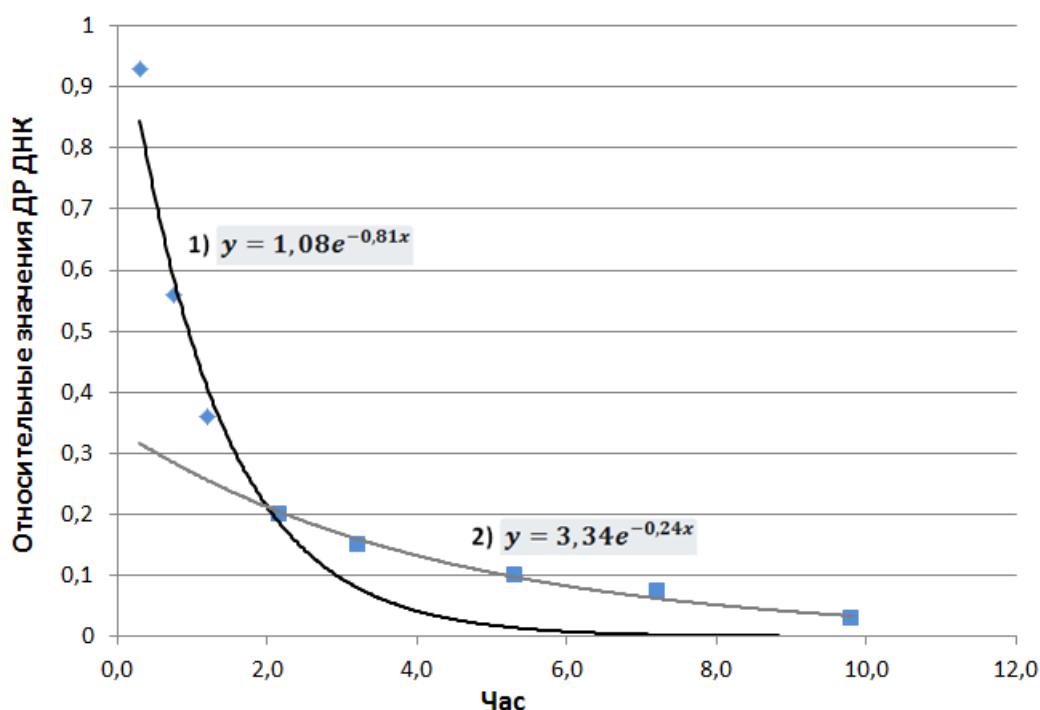


Рисунок 8 – Аппроксимация процесса репарации (относительные значения ДР ДНК из [115, 118]) двумя экспоненциальными зависимостями

Считая, что активность у НТО постоянная, а у ОСТ линейно меняется со временем, а также, интегрируя с учетом двух экспоненциальных зависимостей, получим формулы для оценки остаточного числа распадов, приводящих к наличию ДР ДНК в конце периода  $T$ :

$$N = \int_0^{T-\theta} A(t) a_2 e^{-b_2(T-t)} dt + \int_{T-\theta}^T A(t) a_1 e^{-b_1(T-t)} dt$$

$$A(t) = A_T = \text{const}; N = \frac{A_T a_2}{b_2} (e^{-b_2 \theta} - e^{-b_2 T}) + \frac{A_T a_1}{b_1} (1 - e^{-b_1 \theta})$$

$$A(t) = \frac{A_T}{T} t; N = \frac{A_T a_2}{T b_2} ((T - 1 - \theta) e^{-b_2 \theta}) + \frac{A_T a_1}{T b_1} (T - 1 - (T - 1 - \theta) e^{-b_1 \theta})$$

Альтернативный простой расчет числа распадов трития можно сделать для тритиевой воды (HTO,  $^3\text{H}_2\text{O}$ ), учитывая однородность и равномерность ее распределения в среде и клетках. Количество распадов трития определяется числом распадов в единице массы (объема) воды в среде по отношению к массе (объему) воды в клетке, при этом в большинстве экспериментальных исследований принят коэффициент воды в клетке равный 0,8.

$$A_C = 0,8 \cdot A \cdot t / V_C, \quad (15)$$

где,  $A_C$  – накопленная активность в клетке (число распадов трития) за время  $t$  (сек),  $V_C$  (мл) – объем клетки (плотность клетки считается равной единице),  $A$  (Бк/мл) – объемная активность в среде. Такая же формула используется при расчете активности  $A_N$  в ядре клетки объемом  $V_N$ . Если  $A$  равно 1 МБк/мл, то за 24 часа в сферической клетке (ядре) радиусом 5 мкм (объемом 524 мкм<sup>3</sup>) произойдет всего 36 распадов трития.

При однородности распределения HTO отношение активности в клетке к активности в культуральной среде равно отношению объемов клетки и среды с поправкой на коэффициент 0,8. Поэтому измеряя активность HTO в клетке (ядре), можно однозначно определить средние значения объема клетки (ядра).

Провести теоретическую оценку числа распадов трития ОСТ в клетках (ядрах) на основе только значений удельной активности в среде и размеров клеток (ядер) не представляется возможным. Включение ОСТ в клетках и ядрах зависит от исследуемых клеточных линий и молекулярных механизмов, специфических для каждого вида ОСТ. Необходимы прямые экспериментальные измерения радиоактивности в суспензиях клеток, ядер и/или растворах ДНК. Другим методом определения воздействия разных форм ОСТ являются сравнительные исследования количества ДР ДНК и фокусов белков-маркеров репарации.

### 2.3.3 Кинетика и метаболизм соединений с тритием в организме

Исследования *in vivo* по приему млекопитающими тритированных соединений имеют гораздо больший временной диапазон (от нескольких дней до нескольких месяцев), чем исследования на клетках *in vitro*. Воздействие трития на клеточном уровне в органах млекопитающих зависит от скорости и пути поглощения организмом соединений с тритием, дифференциацией включенных соединений в органах и клетках, временем нахождения трития в клетках и органах.

Тритиевая вода (НТО,  $^3\text{H}_2\text{O}$ ) показала равномерное распределение среди исследованных тканей, за исключением жировой ткани. НТО быстро и равномерно распределяется и включается во все тело, при этом его концентрация пропорциональна содержанию воды в каждой ткани. Пиковая концентрация в крови трития выше. При одноразовом приеме 0,5-3% поступающего в кровь НТО связывается с атомами углерода в результате биосинтеза в организме. Тритий, попадающий в организм в виде меченых биохимических субстратов, таких как аминокислоты, тритированная глюкоза или предшественники ДНК, может окисляться и попадать в воду организма в виде НТО или может быть включен в органические компоненты организма в виде ОСТ без предварительного превращения в НТО.

Время поступления и распределения тритиевых соединений в тканях органов млекопитающих составляет 0,5-2 ч. Предшественники РНК и ДНК, которые не поглощаются клетками в течение примерно 1 часа после попадания в кровообращение, почти полностью разрушаются [1]. Поглощение соединений трития организмом можно оценить параметром абсорбции ( $f_A$ ) [119]. Полное поглощение ( $f_A=1$ ) наблюдается в экспериментах с НТО,  $^3\text{H}$ -аминокислотами,  $^3\text{H}$ -глюкозой и другими органическими соединениями, за исключением  $^3\text{H}$ -нуклеозидов ( $f_A=0,1-0,2$  у  $^3\text{H}$ -тимицина). Для тритидов металлов и люминесцентных красок, как правило, принимается значение  $f_A=0,1$ . Для белковых соединений с тритием, для которых нет конкретной информации,

предполагается, что  $f_A=0,5$ , т.е. 50% трития, поступившего в кровь, быстро переходит в НТО и 50% включается в обменный тритий. Биокинетика же предшественников меченых тритием нуклеиновых кислот сильно зависит от видов млекопитающих [62, 127], поэтому без соответствующих биокинетических данных человека моделирование  $^3\text{H}$ -нуклеозидов остается неопределенной.

В литературе предложен ряд моделей биокинетики трития в организме млекопитающих. В сложных моделях предпринимались попытки, учитывающие биохимический состав ОСТ как смеси тритированных углеводов, жиров и белков, скорость окисления пищевых компонентов, абсорбцию из пищеварительного тракта, а также синтез и удержание органических форм, а также скорости выведения НТО и ОСТ [82, 121-124]. В настоящее время используются более простые метаболические модели всасывания трития в кровь в виде НТО и после приема ОСТ для расчета ожидаемой эффективной дозы [1]. Соответствующие наборы дозовых коэффициентов применяются в документах ВОЗ [125] и в его международных стандартах МАГАТЭ [126].

Данные исследований на лабораторных животных и людях, подвергшихся воздействию соединений с тритием, указывают на то, что задержка трития в организме может быть достаточно хорошо описана как сумма двух или трех экспоненциальных слагаемых [127]. Первая экспонента описывает удержание в организме обменного трития с водой, вторая – долгоживущего незаменяемого трития в соединениях с ОСТ, где обмен водорода незначительный. Все биокинетические модели предполагают равномерное распределение трития в органах и клетках, что не справедливо для предшественников ДНК.

При эквимолярных количествах, скорость включения  $^3\text{H}$ -тимицина в долгоживущий компонент различных пролиферирующих тканей мышей выше в 1,2-5,2 раз, чем у других предшественников РНК и ДНК, но ниже чем у  $^3\text{H}$ -аминокислот в 2,2-3,8 раза. Распределение и периоды полураспада активности  $^3\text{H}$ -аминокислот между долгоживущими компонентами различных пролиферирующих тканей схоже с распределением меченых предшественников нуклеиновых кислот, за исключением селезенки и лимфатического узла, где

оборот  $^3\text{H}$ -аминокислот увеличивается примерно в 2 раза по сравнению с  $^3\text{H}$ -нуклеозидами [128].

Поскольку другие  $^3\text{H}$ -нуклеозиды у крыс и мышей менее эффективно включаются, чем  $^3\text{H}$ -тимидин, в популяции как дифференцирующихся, так и долгоживущих клеток, считается, что из всех предшественников нуклеиновых кислот  $^3\text{H}$ -тимидин представляет наибольшую долгосрочную опасность. Кроме того, ДНК метаболически более стабильно, чем РНК, а интенсивность мечения ДНК долгоживущих клеток постепенно увеличивается из-за повторного использования в синтезе ДНК меченых продуктов распада РНК.

Тритированные аминокислоты и предшественники РНК распределяются почти по всем клеткам организма, включая ДНК-синтезирующие клетки, тогда как специфические предшественники ДНК и белков хроматина включаются только в те клетки, которые находятся в синтезе ДНК. Клетки, синтезирующие ДНК, располагаются в основном в тканях с относительно быстрым обновлением клеток. Желудочно-кишечный тракт содержит примерно 50% всех ДНК-синтезирующих клеток в организме млекопитающих, примерно 10-20% находятся в костном мозге, 4-5% в коже, 1,5-3,0% в селезенке, 1,0-2,0% в тимусе, печени, мускулах, лимфе [129].

Предполагается, что  $^3\text{H}$ -аминокислоты с белками и РНК распределены по всей клетке и также в межклеточном пространстве. Включенный в ядра клеток тритий является основным источником поглощенной радиации в целевом объеме ядра. Так как  $^3\text{H}$ -аминокислоты могут быть включены в гистоны и другие белки хромосом, которые имеют медленный оборот, их воздействие можно оценить путем сопоставления аминокислотного состава белков в хроматине с количеством  $^3\text{H}$ -тимидина.

В связи с высокой скоростью включения тимидина в ядра клеток пролиферирующих тканей и длительного сохранения предшественников ДНК в долгоживущих клетках, считается, что воздействие  $^3\text{H}$ -тимидина оказывает наибольший соматический эффект из всех тритированных соединений, а воздействие НТО наименьший. В нашей работе рассматривается сравнение

количества белков-репарации ДР ДНК от этих двух соединений с тритием, потребляемых перорально, со слабой активностью в экспериментах с крысами. Слабая активность приводит к редкой маркировке клеток тритием в тканях органов млекопитающих с единичным числом его распадов в ядрах клеток, поэтому средняя доза для тканей органов является ненадежным индикатором токсичности трития на клеточном уровне.

В настоящей диссертационной работе проводились исследования на крысах. Биокинетика трития в организме крыс подробно исследовалась в работах [77, 78, 83, 84]. Отношение удельной активности в различных тканях к удельной активности НТО в питьевой воде (TDF) представлено на рисунке 9 по данным из [88].

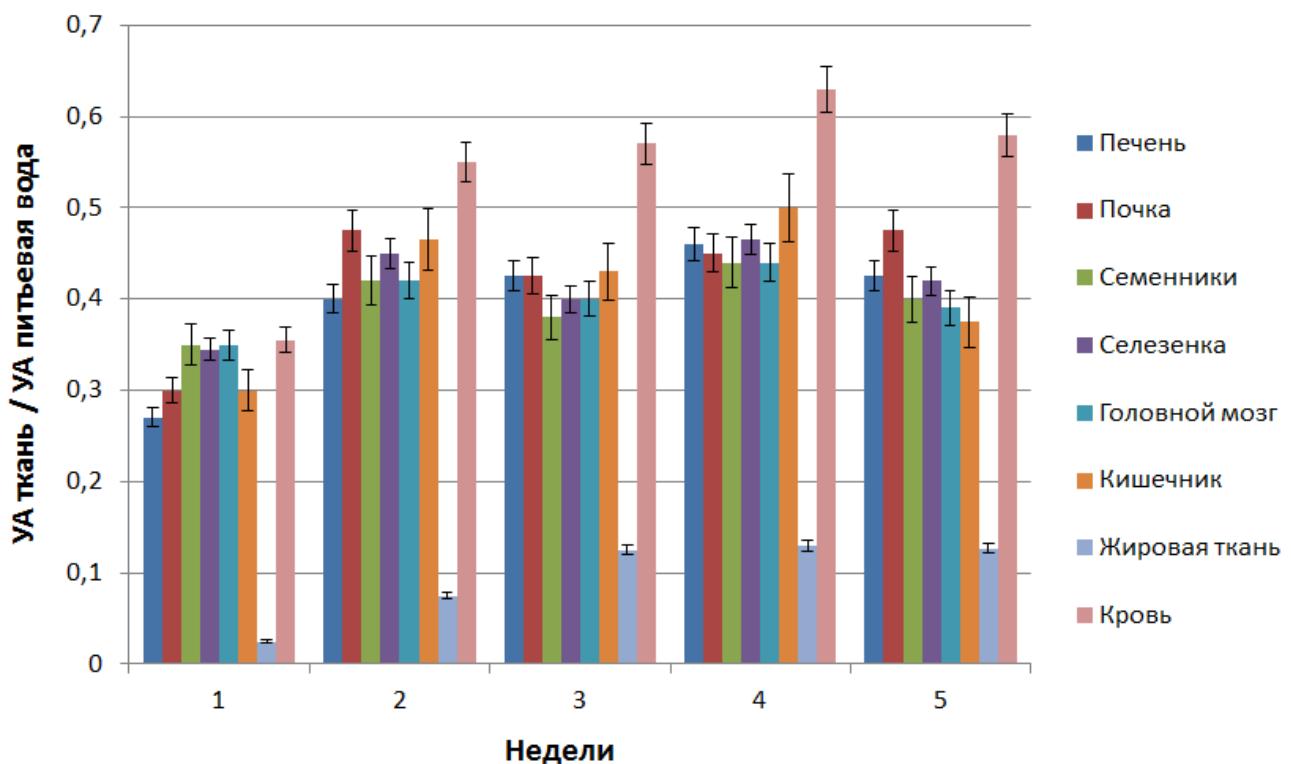


Рисунок 9 – Отношение удельной активности в различных тканях крыс к удельной активности НТО в питьевой воде (TDF) за 5 недель [88]

Как видно из рисунка 9, наблюдается стабилизация удельной активности трития в тканях, начиная с конца второй недели потребления крысами НТО. За исключением жировой ткани и крови, распределение трития в тканях однородно и определяется количеством воды в различных тканях.

Далее удельную активность ОСТ в тканях можно оценить из отношения удельных активностей отдельных форм ОСТ к удельной активности НТО. С целью определения активности соединений с тритием в тканях различных органов используются значения коэффициентов, представляющих собой отношение удельных активностей этих соединений к удельной активности НТО из работы [84]. Считая значение НТО за единицу, на рисунке 10 представлены значения отношений удельных активностей ОСТ к НТО.

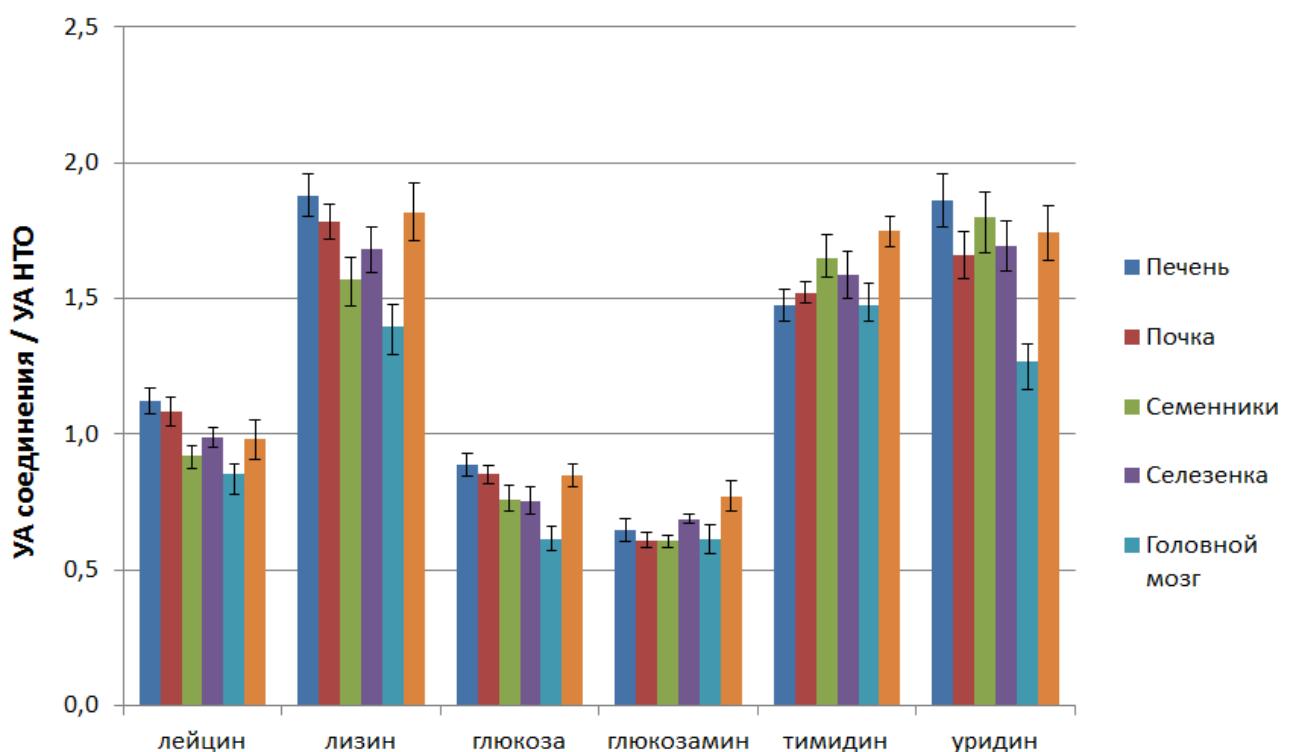


Рисунок 10 – Отношение удельной активности соединений с тритием к удельной активности НТО на 22 день хронического воздействия [84]

Наблюдается явная зависимость уровня радиоактивности трития в тканях от вида ОСТ. Наиболее высокий уровень показывают нуклеозиды (тимидин и уридин), а из аминокислот – лизин.

## ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

3.1 Эксперименты *in vitro*

## 3.1.1 Общая схема экспериментов

Общая схема экспериментов состоит из двух этапов:

1) Подготовка клеток к иммуноцитохимическим исследованиям, в ходе которой происходит облучение культуры клеток в растворе с заданной объемной активностью трития в форме НТО/ОСТ в условиях СО<sub>2</sub>-инкубатора. Операции, осуществляемые на данном этапе исследований, представлены на рисунке 11.

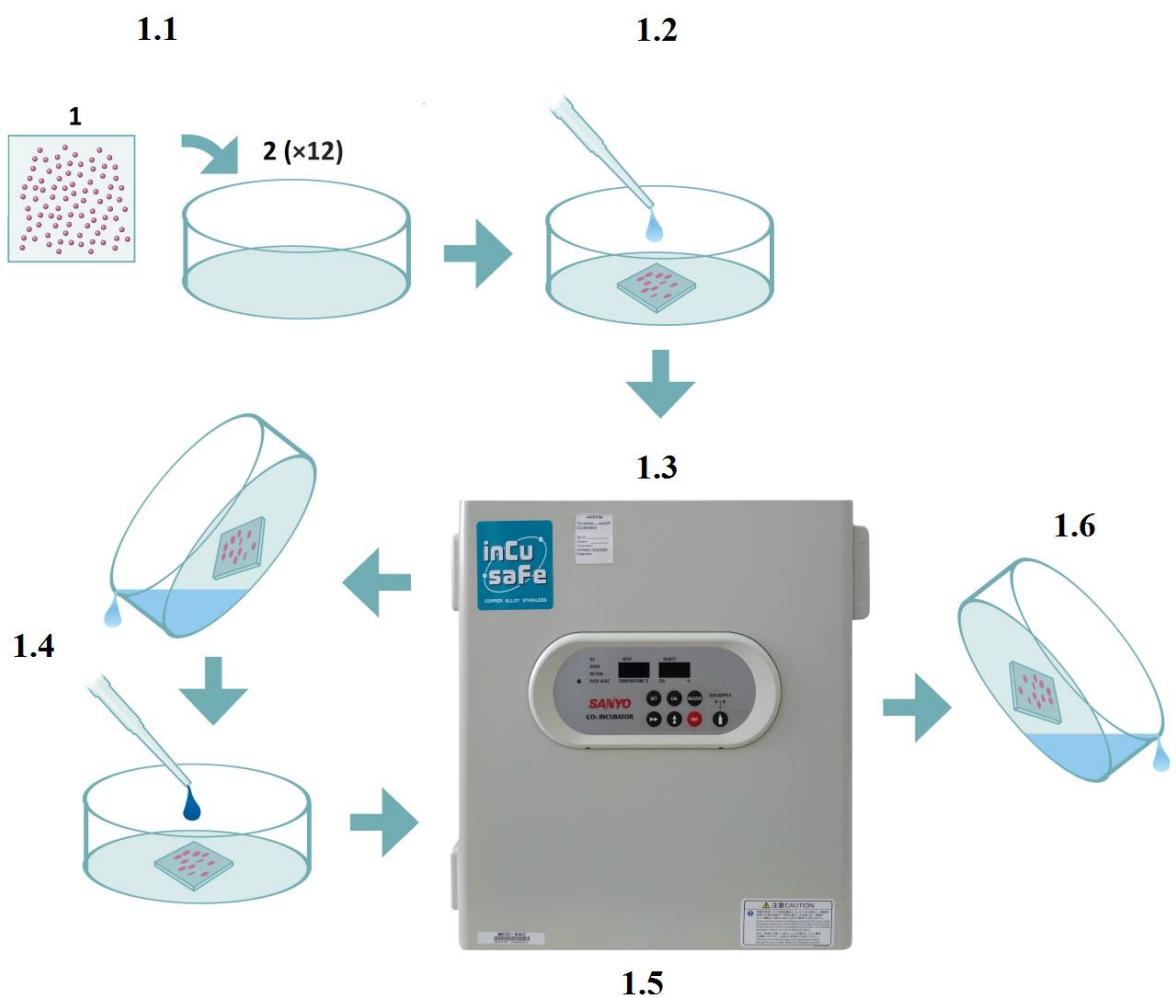


Рисунок 11– Подготовка культуры клеток к иммуноцитохимическим исследованиям

1.1 Предварительно подготовленную культуру клеток – 0,5 мл клеточной суспензии – высаживают на покровные стекла (1), помещенные в чашки Петри (2) диаметром 35 мм из расчета  $4 \cdot 10^4$  клеток на 1 покровное стекло.

1.2 Чашки оставляют на 15 минут для адгезии клеток, и затем добавляют по 1,5 мл питательной среды в каждую чашку.

1.3 Инкубация клеток осуществляется в течение 24 часов в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 37° С и концентрации CO<sub>2</sub> в 5 %.

1.4 Чашки извлекаются из инкубатора, после чего из них сливается питательная среда и добавляется свежая среда, содержащая НТО/ОСТ с необходимой объемной активностью трития.

1.5 Инкубация клеток осуществляется в течение 24 часов в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 37 °С и концентрации CO<sub>2</sub> в 5 %.

1.6 Клетки извлекаются из инкубатора, питательная среда с НТО/ОСТ сливается, при этом клетки в виде монослоя остаются прикрепленными на покровном стекле. Покровные стекла извлекаются для дальнейших исследований.

2) На втором этапе происходит химическая обработка и иммуноцитохимическое окрашивание клеток с целью «визуализации» их ядер и визуальный анализ ядер с помощью люминесцентного микроскопа, оснащенного видеокамерой высокого разрешения.

### 3.1.2 Культуры клеток в экспериментах

В экспериментах при инкубации с соединениями трития использовались культуры клеток МСК костного мозга человека и фибробластов легкого человека MRC-5.

В экспериментах с <sup>3</sup>H-тимидином и НТО использовалась первичная культура МСК костного мозга человека 5-6 пассажа, полученную из коллекции ООО «БиоЛоТ» (Россия). Культивирование осуществлялось в культуральных вентилируемых флаконах с площадью дна 25 см<sup>2</sup> (Corning®, США) в концентрации  $0,3 \cdot 10^6$  на флакон в культуральной среде (MesenCultTM MSC Basal Medium with supplement, StemCellTM Technologies, Канада). К среде добавлялись

L-глютамин и антибиотики (пенициллин-стрептомицин, Sigma-Aldrich, США). Клетки культивировались в стандартных условиях СО<sub>2</sub>-инкубатора до 3 пассажа, среда обновлялась раз в три дня. При достижении 75-80% монослоя, клеточную культуру снимали с пластика ферментативным путем.

В экспериментах с <sup>3</sup>Н-тимидином и <sup>3</sup>Н-аминокислотами использовалась клеточная линия MRC-5 – хорошо охарактеризованные нормальные фибробласти человека, одобренные для радиобиологических исследований (клетки получены из Института молекулярной биологии НАН Республики Армения). Клетки культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 1 г/л глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) в стандартной атмосфере СО<sub>2</sub>-инкубатора (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 3.1.3 Инкубация с соединениями трития

В зависимости от условий эксперимента в питательную среду добавляли стерильные растворы, содержащие одно из тритиевых соединений:

- НТО с начальной радиоактивностью от производителя  $1,06 \cdot 10^9$  Бк/л (ФГУП «ВНИИФТРИ»);
- <sup>3</sup>Н-тимидин с начальной радиоактивностью от производителя  $3,89 \cdot 10^{10}$  Бк/л (American Radiolabeled Chemicals, Inc);
- <sup>3</sup>Н-аминокислоты (<sup>3</sup>Н-аланин, <sup>3</sup>Н-глицин, <sup>3</sup>Н-пролин) с начальной радиоактивностью от производителя для каждой аминокислоты  $3,7 \cdot 10^{10}$  Бк/л (American Radiolabeled Chemicals, Inc).

Конечная объемная радиоактивность составила 100, 200, 300 и 400 МБк/л. Клетки инкубировались на покровных стеклах в чашках Петри, содержащих среду с тритиевыми соединениями в течение 24 ч при стандартных условиях СО<sub>2</sub>-инкубатора.

### 3.1.4 Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки фиксировались в течение 20 мин на покровных стеклах параформальдегидом (4%) в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) при комнатной температуре. Затем дважды промывались фосфатно-солевым буфером (рН 7,4).

Пермеабилизация осуществлялась 0,3% Тритон-Х100 в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

В зависимости от условий эксперимента слайды инкубировали со следующими первичными антителами:

- кроличьи моноклональные антитела к белку  $\gamma$ H2AX (клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200;
- мышиные моноклональные антитела к фосфорилированному белку ATM (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400;
- мышиные моноклональные антитела к белку 53BP1 (клон BP13, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200.

Затем слайды промывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными со следующими флуорохромами:

- антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600;
- антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина.

Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония). Микроскоп оснащен видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) и набором светофильтров UV-2E/C (340-380 нм возбуждение и 435-485 нм эмиссия), B-2E/C (465-495 нм возбуждение и 515-555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540-580 нм возбуждение и 600-660 нм эмиссия).

Анализировалось не менее 300 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов  $\gamma$ H2AX, ATM и 53BP1 использовали программу DARFI (источник: <http://github.com/varnivey/darfi>).

На рисунке 12 представлен пример анализа фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в МСК человека.

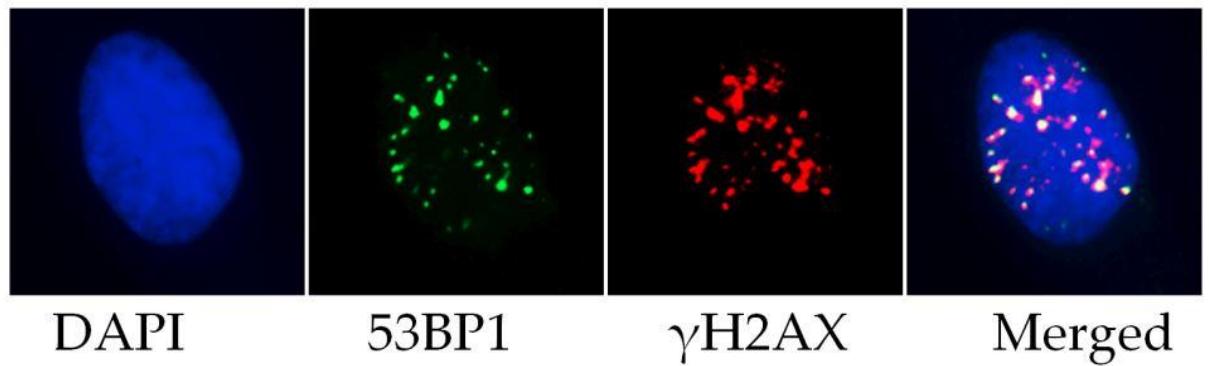


Рисунок 12 – Пример анализа фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в МСК человека. Слева направо: ДНК клеточного ядра, окрашенное DAPI (синий); фокусы 53BP1 (зеленые точки); фокусы  $\gamma$ H2AX (красные точки); наложенные микроизображения (merged)

На рисунке 13 представлен пример анализа фокусов pATM и  $\gamma$ H2AX в МСК человека.

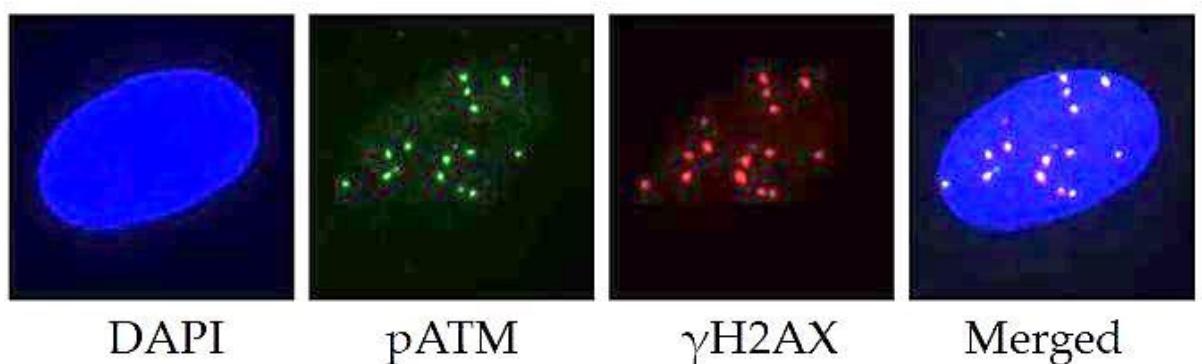


Рисунок 13 – Пример анализа фокусов pATM и  $\gamma$ H2AX в МСК человека. Слева направо: ДНК клеточного ядра, окрашенное DAPI (синий); фокусы pATM (зеленые точки); фокусы  $\gamma$ H2AX (красные точки); наложенные микроизображения (merged)

### 3.1.5 Измерение удельной радиоактивности в клетках, ядрах и ДНК

Для сравнительного анализа включения  $^{3}\text{H}$ -тимицина и НТО в клеточные структуры, МСК инкубировали в полной культуральной среде с добавлением  $^{3}\text{H}$ -тимицина и НТО с объемной радиоактивностью 79,3 МБк/л в течение 24 ч. После этого клетки отмывали от среды культивирования, ресуспенсировали в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1 млн клеток/мл. Выделение ядер из клеток выполняли с использованием наборов Nuclei Isolation Kit: Nuclei EZ Prep (Sigma-Aldrich) согласно протоколу производителя. Выделенные ядра ресуспенсировали в фосфатно-солевом буфере в концентрации 0,1 млн/мл. Клеточная ДНК выделялась с использованием наборов GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), согласно протоколу производителя. Измерение концентрации ДНК проводили на портативном флуориметре Qubit (Thermo Scientific) с использованием наборов Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific).

Измерение удельной активности трития в суспензиях клеток и ядер, а также в растворах ДНК были произведены на жидкостном сцинтилляционном анализаторе Tri-Carb 3180 TR/SL (PerkinElmer). Измерение производилось на протяжении 2 часов.

### 3.1.6 Статистический анализ

Статистический и математический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft) и Microsoft Excel. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка средней.

## 3.2 Эксперименты *in vivo*

### 3.2.1 Экспериментальные животные и соединения трития

В исследовании использованы 18 крыс-самцов Wistar из питомника лабораторных животных «Пущино» (Московская обл., Россия), имеющих массу тела  $371 \pm 26$  г. Эксперименты выполнены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране

животных, используемых в научных целях [130]. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

Животных разделили на 3 группы: «Контроль», «НТО» и « $^3\text{H}$ -тимидин», по 6 особей в каждой. Крыс из разных групп размещали в отдельных помещениях и содержали в поликарбонатных клетках. Крысы группы «Контроль» получали дистиллированную воду, животные двух других групп потребляли дистиллированную воду с соединениями трития (НТО или  $^3\text{H}$ -тимидин) с объемной активностью  $200\pm11$  кБк/л. Объем потребляемой жидкости фиксировали ежедневно. При аутопсии крыс на 28 сутки эксперимента от каждой крысы брали костный мозг и селезенку.

### 3.2.2 Оценка повреждений ДНК по фокусам $\gamma\text{H2AX}$ в спленоцитах

Определяли уровень повреждений ДНК (фокусы  $\gamma\text{H2AX}$ ) в клетках селезенки крыс, получавших в течение 28 суток с питьем НТО или  $^3\text{H}$ -тимидин с объемной активностью 200 кБк/л.

Спленоциты выделяли путём механической гомогенизации селезенки в охлаждённом до 4°C фосфатно-солевом буфере (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4). Количество фосфатно-солевого буфера рассчитывалось как 1 мл буфера на 10 мг ткани лимфоидного органа.

Далее клеточная суспензия фильтровалась дважды через нейлоновый фильтр Falcon<sup>TM</sup> Cell Strainers (Thermo Fisher Scientific, США) с размером ячейки 40 мкм и центрифугировалась 15 минут на 250 g для концентрирования клеток. Надосадочная жидкость удалялась с помощью пипетки. Полученные в осадке клетки ресуспенсировали в 1 мл ледяного этилового спирта (70°C) и помещали на 4 часа в морозильную камеру при температуре -20°C.

Перед анализом образцы центрифугировали дважды в фосфатно-солевом буфере, содержащим 0,3% BSA и ресуспенсировали в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации  $1\cdot10^6$  клеток/мл. Концентрация клеток определялась с использованием камеры Горяева в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя на световом микроскопе Olympus CKX-41 (Olympus, Япония).

Далее проводилось иммуноцитохимическое окрашивание по методике, изложенной в главе 3.1.3. В экспериментах образцы инкубировали с:

- первичными кроличьими моноклональными антителами к белку γH2AX (Abcam, rb mAb ab81299 lot GR3203642-12) в разведении 1/500;
- вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (ab150077 lot GR3442008-1, Life Technologies, США) в разведении 1/1000.

Подсчет количества фокусов проводился вручную. Анализировалось не менее 500 клеток на крысу (не менее 3 тысяч клеток на экспериментальную группу).

### 3.2.3 Оценка количества микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга

На основе методических рекомендаций [131] были подготовлены образцы клеток костного мозга для подсчета микроядер. При подготовке препаратов проводили трепанационную биопсию, мазки фиксировали и окрашивали ацетоорсенином-светлым зеленым.

Для цитогенетического анализа стекла шифровали. Учет микроядер проводили методом световой микроскопии. Использовался микроскоп Olympus CH30 при общем увеличении  $\times 1000$  с масляной иммерсией. Анализировали по 1000 клеток костного мозга от каждого животного. Доля ПХЭ от суммы ПХЭ и нормохромных эритроцитов определялась при дополнительном подсчете 200 эритроцитов.

### 3.2.4 Статистический анализ

Результаты статистически обрабатывали в программах Microsoft Excel и Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Определяли среднее значение показателей в группах, ошибку среднего и стандартное отклонение. Межгрупповые сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни и по критерию  $\chi^2$ . Отличия считали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Результаты радиобиологических экспериментов *in vitro*

#### 4.1.1 Измерение радиоактивности в клетках

Радиоактивность трития измерялась в МСК человека, инкубированных с  $^3\text{H}$ -тимидином или НТО. С целью определения удельной активности клеточных структур МСК костного мозга человека инкубировали в полной культуральной среде с добавлением  $^3\text{H}$ -тимицина и НТО с объемной радиоактивностью 79,3 МБк/л в течение 24 ч. Радиоактивность измерялась отдельно в выделенных суспензиях клеток, ядер и ДНК с соответствующей концентрацией 1 млн клеток / мл, 1 млн ядер / мл и 1 мкг / мл и полученные значения представлены в таблице 3.

Исходные измерения радиоактивности были пересчитаны для одиночных клеток, ядер и ДНК и также представлены в таблице 3 как среднее число распадов в мин. При расчете радиоактивности на одно ДНК учитывается масса ДНК в 6,0 пикограмм.

Таблица 3 – Результаты измерения радиоактивности и анализа включения  $^3\text{H}$ -тимицина и НТО в клетках, ядрах и ДНК в МСК человека при объемной активности в среде 79,3 МБк/л

Соединение	Радиоактивность 1 млн клеток, Бк	Радиоактивность 1 млн ядер, Бк	Радиоактивность 1 мкг ДНК, Бк
Контроль	0	0	0
НТО	198±26	32±5	6±2
$^3\text{H}$ -тимицин	17267±1960	5816±741	930±135
Соединение	Среднее число распадов на клетку в мин	Среднее число распадов на ядро в мин	Среднее число распадов на ДНК в мин
НТО	0,0119±0,0016	0,0019±0,0003	0,0022±0,0007
$^3\text{H}$ -тимицин	1,04±0,12	0,35±0,04	0,33±0,05

Измерения радиоактивности и оценка числа распадов трития показывают высокую скорость включения  $^3\text{H}$ -тимицина по отношению к НТО в ДНК клеток. Скорость распада трития на ядро и ДНК у  $^3\text{H}$ -тимицина почти одинакова, что

подтверждает теоретические представления, что фактически весь  $^{3}\text{H}$ -тимидин в ядре включается в состав ДНК.

#### 4.1.2 Клетки МСК и MRC-5 человека

По результатам измерения радиоактивности НТО можно оценить объем ядер и клеток МСК. Принимая во внимание однородность распределения НТО, отношение активности в клетке или ядре к активности в культуральной среде равно отношению объемов клетки или ядра к объему культуральной среды. При этом следует учитывать поправочный коэффициент (0,7-0,8) содержания воды в клетках и ядрах.

Принимая во внимание измеренную радиоактивность НТО в клеточных структурах МСК (таблица 3) при объемной радиоактивности 79,3 МБк/л в полной культуральной среде, были получены средние значения объема клетки МСК в  $3100 \text{ мкм}^3$  и объема ядра в  $500 \text{ мкм}^3$ . В случае сферической геометрии диаметр клетки тогда составит  $\sim 18 \text{ мкм}$ , а ядра  $\sim 10 \text{ мкм}$ .

Указанные значения размеров ядра и клетки согласуются с оценкой размера и объема МСК из литературных источников. В [132] представлено распределение диаметров МСК во взвешенном состоянии в среде с диапазоном от 6,1 до 30,6 мкм для 2090 клеток со средним значением  $16,2 \pm 3,0 \text{ мкм}$ . При этом средний размер МСК увеличивается от ранних к поздним пассажам. В работе [133] получены средние диаметры клеток в диапазоне 17-21 мкм для большинства МСК во взвешенном состоянии.

Известно, что размеры МСК изменяются в зависимости от нахождения клеток в среде или в монослое. В монослое МСК костного мозга человека имеют форму тонких длинных отростков, а во взвешенном состоянии клетки имеют округлую форму со средним диаметром  $\sim 18 \text{ мкм}$  [134]. При этом размер ядер МСК костного мозга относительно размера клетки небольшой и ядра имеют почти круглую форму. На рисунке 14 представлены микрофотографии клеток МСК и MRC-5 в монослое.

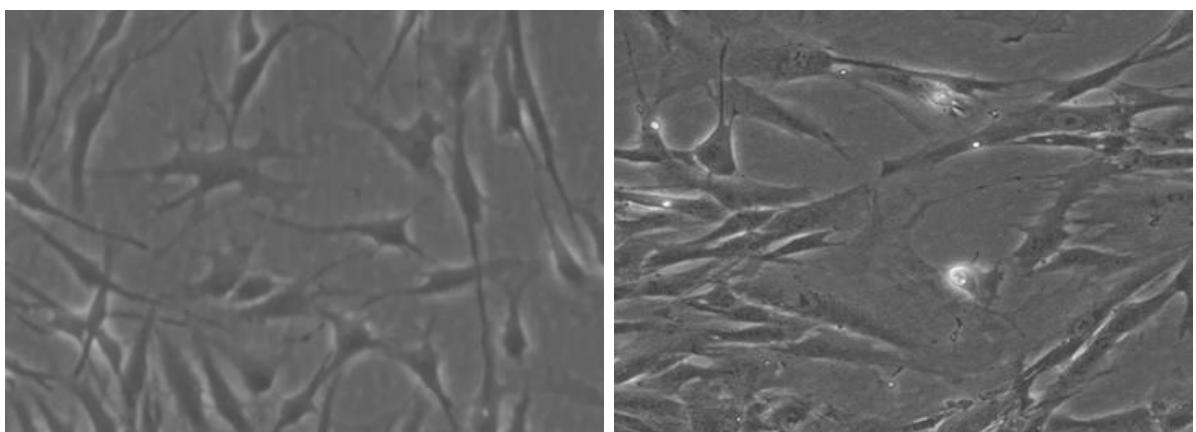


Рисунок 14 – Микрофотографии клеток МСК (слева) и MRC-5 (справа)

В проведенных нами экспериментах *in vitro* с тритием на клетках МСК и MRC-5 в монослое визуально фиксировались только ядра клеток, которые имели овальную форму, а размеры ядер МСК и MRC-5 со средним диаметром 10-12 мкм были близки в настоящих исследованиях и сопоставимы с литературными данными. Имеется определенное сходство у МСК и MRC-5 в отношении формы, размеров, объемов и времени клеточного цикла. На рисунке 15 представлено схематическое изображение клеток, исследуемых в экспериментах.

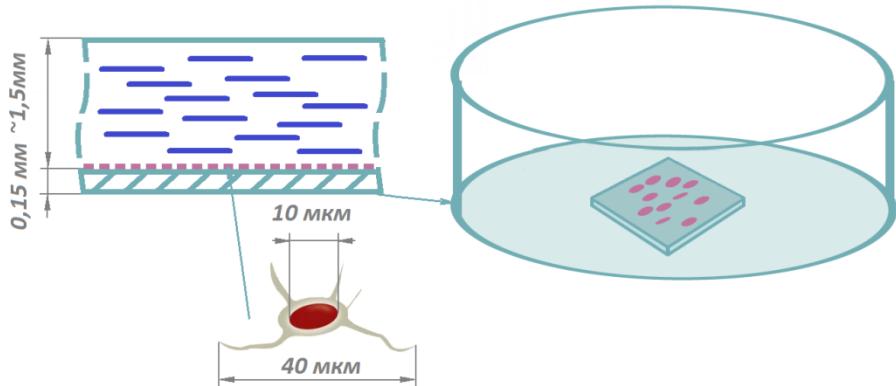


Рисунок 15 – Схематическое изображение клеток, исследуемых в экспериментах

Способы культивирования МСК костного мозга и MRC-5 в проведенных исследованиях имели одинаковый характер. Клетки были не синхронизированы и находились в разных стадиях клеточного цикла, у МСК доля пролиферирующих клеток через 24 ч составила ~80% [36].

Время удвоения популяции МСК костного мозга в среднем составляет 38-55 ч [135], а MRC-5 человека 35-45 ч [136]. Учитывая почти одинаковые объемы

ядер и размеры МСК костного мозга и MRC-5, а также методы их культивирования и время инкубации 24 ч в среде с тритием (что меньше времени удвоения популяций клеток) можно предположить, что дозы радиации в ядрах МСК костного мозга и фибробластов лёгкого человека будут иметь сопоставимые значения.

#### 4.1.3 Оценка поглощенной дозы радиации в ядрах МСК костного мозга

Основываясь на исследованиях *in vitro* [25, 47, 113, 114] по включению соединений с тритием в ДНК, ядра и клетки при расчете поглощенной дозы ядром клетки принято, что:

- 1) НТО быстро и равномерно распределяется по всему объему воды в культуральной среде и клетке, вода в ядре и клетке составляет 80% всей их массы;
- 2)  $^{3}\text{H}$ -тимидин включается в ДНК в фазе S клеточного цикла линейно со временем инкубации;
- 3) Количество распадов трития в ядрах и клетках линейно увеличивается с ростом объемной активности культуральной среды;
- 4) Поглощенная доза за один распад трития в ядре и цитоплазме клетки определяется в соответствии с методикой, изложенной в Главе 2 настоящей диссертации.

Измерение радиоактивности непосредственно для ядер и клеток позволяет определить число распадов трития ( $^{3}\text{H}$ ) в единицу времени. В экспериментах по анализу количества фокусов представляет интерес поглощенная доза трития ( $^{3}\text{H}$ ) за 24 часа и ее оценка, учитывая эфект репарации ДР ДНК («остаточная» поглощенная доза). Расчет количества распадов ( $N$ ) трития отдельно в ядре и цитоплазме определялся по формуле (14), где функция активности от времени у НТО постоянная, а у  $^{3}\text{H}$ -тимицина линейно меняется со временем. При этом при оценке «остаточной» поглощенной дозы ядром клетки учитывается двухкомпонентная экспоненциальная аппроксимация процесса репарации из п. 2.4.2.

Доза, полученная ядром клетки на один распад (S-значение) трития непосредственно в ядре и цитоплазме определяется в соответствии методикой, изложенной в разделе 2.2. При этом учитывались размеры сферических ядер и клеток со средними диаметрами соответственно в 10 и 18 мкм, а также спектральный энергетический состав бета-излучения трития.

В таблице 4 приведены данные расчета поглощенной дозы трития ( ${}^3\text{H}$ ) за 24 часа при соответствующей объемной активности в среде, числа распадов трития в МСК и S-значений при определенных размерах ядра и цитоплазмы клетки МСК.

Таблица 4 – Поглощенная доза трития ( ${}^3\text{H}$ ) при инкубации в течение 24 часов с  ${}^3\text{H}$ -тимидином или НТО при соответствующей объемной активности в среде, распадов трития в ядрах и цитоплазме МСК (погрешность поглощенной дозы ядром определяется погрешностью в измерении радиоактивности (таблица 4) и составляет  $\sim 11\%$ ).

Источник ${}^3\text{H}$	Число распадов при 79,3 МБк/л	Доза на распад ${}^3\text{H}$	Объемная активность среды, МБк/л						
			79,3	100	200	300	400		
Полная поглощенная доза ядром за 24 ч, Гр									
НТО									
ядро	2,8	1,38E-03	3,85E-03	4,82E-03	9,63E-03	1,44E-02	1,93E-02		
цитоплазма	14,3	6,64E-05	9,49E-04	1,19E-03	2,37E-03	3,56E-03	4,75E-03		
Доза, Гр			4,80E-03	6,00E-03	1,20E-02	1,80E-02	2,40E-02		
${}^3\text{H}$ -тимидин									
ядро	252	1,38E-03	3,47E-01	4,33E-01	8,67E-01	1,30E+00	1,73E+00		
цитоплазма	494	6,64E-05	3,28E-02	4,10E-02	8,20E-02	1,23E-01	1,64E-01		
Общая доза, Гр			3,80E-01	4,74E-01	9,49E-01	1,42E+00	1,90E+00		
«Остаточная» поглощенная доза ядром с учетом reparации ДР ДНК, Гр									
НТО									
ядро	0,23	1,38E-03	3,16E-04	3,96E-04	7,91E-04	1,19E-03	1,58E-03		
цитоплазма	1,43	6,64E-05	9,46E-05	1,18E-04	2,37E-04	3,55E-04	4,73E-04		
Доза, Гр			4,11E-04	5,14E-04	1,03E-03	1,54E-03	2,06E-03		
${}^3\text{H}$ -тимидин									
ядро	39	1,38E-03	5,37E-02	6,71E-02	1,34E-01	2,01E-01	2,68E-01		
цитоплазма	116	6,64E-05	7,70E-03	9,62E-03	1,92E-02	2,89E-02	3,85E-02		
Доза, Гр			6,14E-02	7,67E-02	1,53E-01	2,30E-01	3,07E-01		

Доза, полученная ядром от источников бета-излучения трития в ядре и цитоплазме, составляет для НТО соответственно около 77% и 23%, а для  $^3\text{H}$ -тимицина около 90% и 10%.

Из приведенных расчетов следует, что полная полученная доза ядром от распада трития за 24 часа составляет при активности 400 МБк/л в среде НТО 0,023 Гр и  $^3\text{H}$ -тимицина 1,9 Гр. Влияние на рассматриваемый эффект в конце периода инкубации (24 ч) из-за процесса репарации ДР ДНК оказывает только часть от полной поглощенной ядром дозы («остаточная» поглощенная доза), которая от распада трития за 24 часа составляет при активности 400 МБк/л в среде НТО ~2 мГр и  $^3\text{H}$ -тимицина ~307 мГр.

#### 4.1.4 Анализ количества фокусов $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, pATM в ядрах МСК костного мозга, инкубированных с $^3\text{H}$ -тимицином и НТО

Анализ количества радиационно-индуцированных фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, pATM проводился в ядрах МСК, инкубированных с  $^3\text{H}$ -тимицином и НТО в течение 24 ч.

Исследовались зависимости индукции фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, pATM в зависимости от радиоактивности в культуральной среде и дозой излучения трития. Полученные данные показали, что через 24 ч после облучения в диапазоне радиоактивности трития в среде от 100 до 400 МБк/л наблюдается увеличение количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и pATM (рисунки 16, 17). В этом диапазоне радиоактивности зависимости «активность-эффект» хорошо аппроксимируются линейными уравнениями, где  $y$  – количество фокусов,  $x$  – радиоактивность в МБк/л.

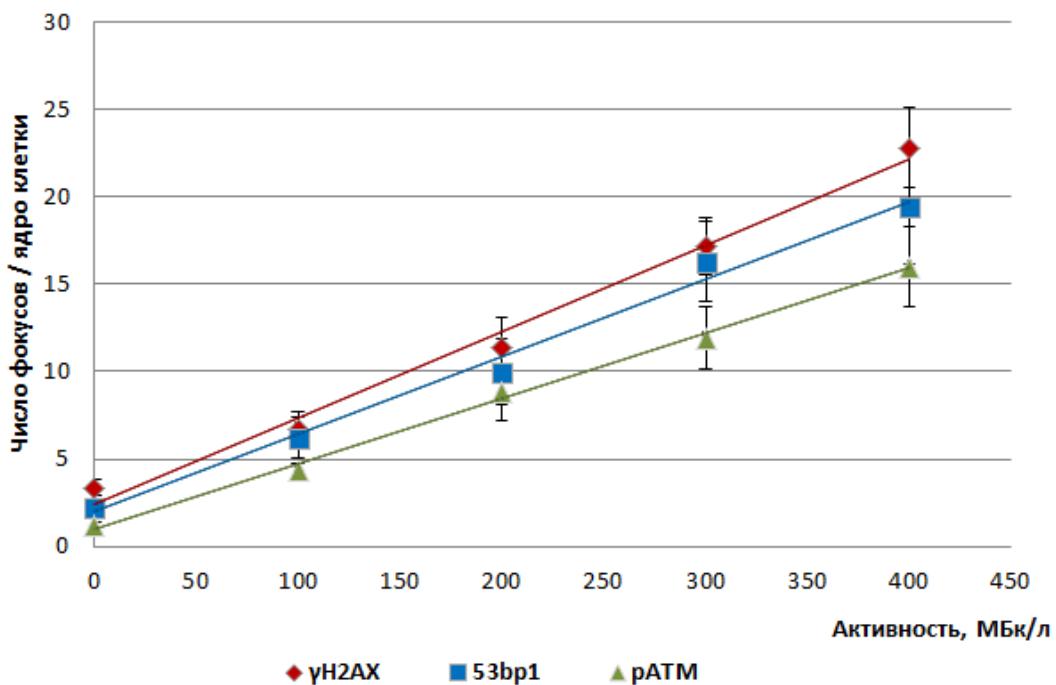


Рисунок 16 – Изменение среднего количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и pATM в зависимости от активности в среде при инкубации с  ${}^3\text{H}$ -тимицином

Линейные зависимости от активности  ${}^3\text{H}$ -тимицина в среде

$$\gamma\text{H2AX}: y = (0,049 \pm 0,003)x + (2,4 \pm 1,4) (R^2 = 0,99);$$

$$53\text{BP1}: y = (0,044 \pm 0,003)x + (2,0 \pm 3,3) (R^2 = 0,99);$$

$$\text{pATM}: y = (0,037 \pm 0,001)x + (1,0 \pm 0,5) (R^2 = 0,99).$$

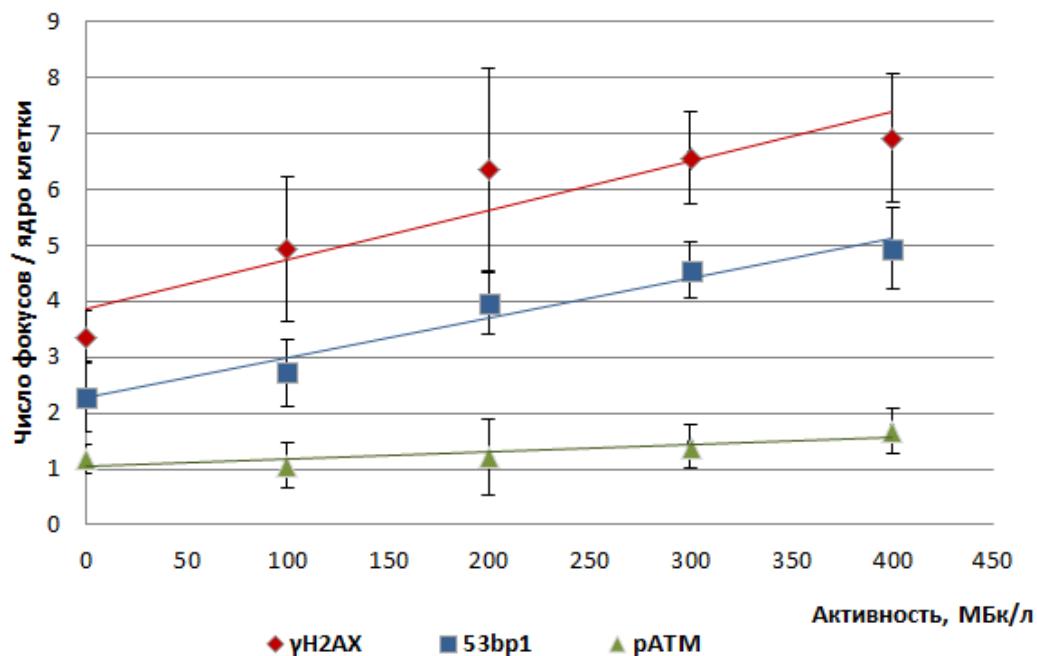


Рисунок 17 – Изменение среднего количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и pATM в зависимости от активности в среде при инкубации с НТО

Линейные зависимости от активности НТО в среде

$$\gamma\text{H2AX: } y = (0,0087 \pm 0,0019)x + (3,9 \pm 0,9) R^2 = 0,88;$$

$$53\text{BP1: } y = (0,0071 \pm 0,0008)x + (2,3 \pm 0,4) R^2 = 0,96;$$

$$\text{pATM: } y = (0,0014 \pm 0,0004)x + (1,0 \pm 0,2) R^2 = 0,99.$$

Увеличение количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и pATM после облучения в линейной зависимости от рассчитанной дозы трития ( ${}^3\text{H}$ ) представлено на рисунках 18-21 при инкубации в течение 24 часов с  ${}^3\text{H}$ -тимидином или НТО. Зависимости доза–эффект аппроксимируются линейными уравнениями, где  $y$  – количество фокусов,  $x$  – поглощенная доза в Гр.

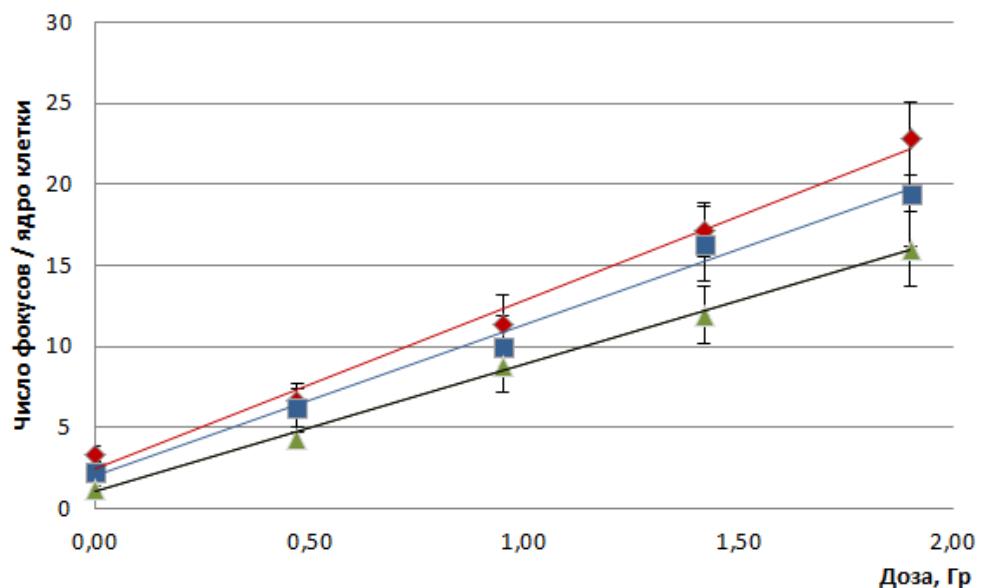


Рисунок 18 – Изменение среднего количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 и pATM в зависимости от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с  ${}^3\text{H}$ -тимидином

Линейные зависимости от полученной дозы  ${}^3\text{H}$ -тимицина за 24 ч (значения  $x$  в Гр)

$$\gamma\text{H2AX: } y = (10,4 \pm 0,6)x + (2,4 \pm 1,4) (R^2 = 0,99);$$

$$53\text{BP1: } y = (9,3 \pm 0,6)x + (2,0 \pm 1,3) (R^2 = 0,99);$$

$$\text{pATM: } y = (7,8 \pm 0,2)x + (1,0 \pm 0,5) (R^2 = 0,99).$$

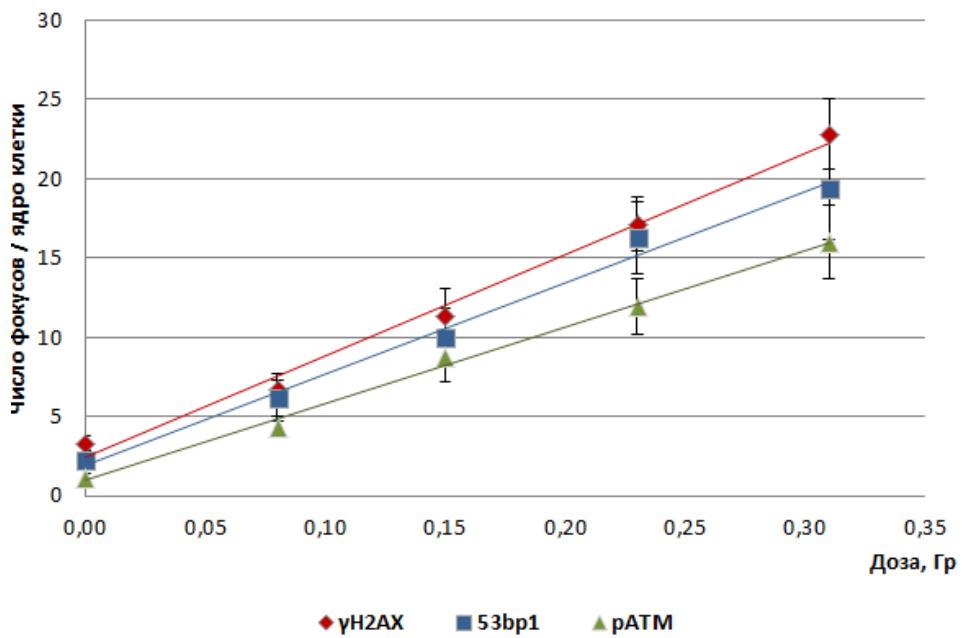


Рисунок 19 – Изменение среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM в зависимости от поглощенной «остаточной» дозы ядром МСК от  ${}^3\text{H}$ -тимицина

Линейные зависимости от полученной «остаточной» дозы  ${}^3\text{H}$ -тимицина за 24 ч (значения x в Гр)

$$\gamma\text{H2AX: } y = (64,1 \pm 3,6)x + (2,4 \pm 1,4) \quad (R^2 = 0,99);$$

$$53\text{BP1: } y = (57,6 \pm 3,4)x + (2,0 \pm 1,3) \quad (R^2 = 0,99);$$

$$\text{pATM: } y = (48,3 \pm 1,9)x + (1,0 \pm 0,7) \quad (R^2 = 0,99).$$

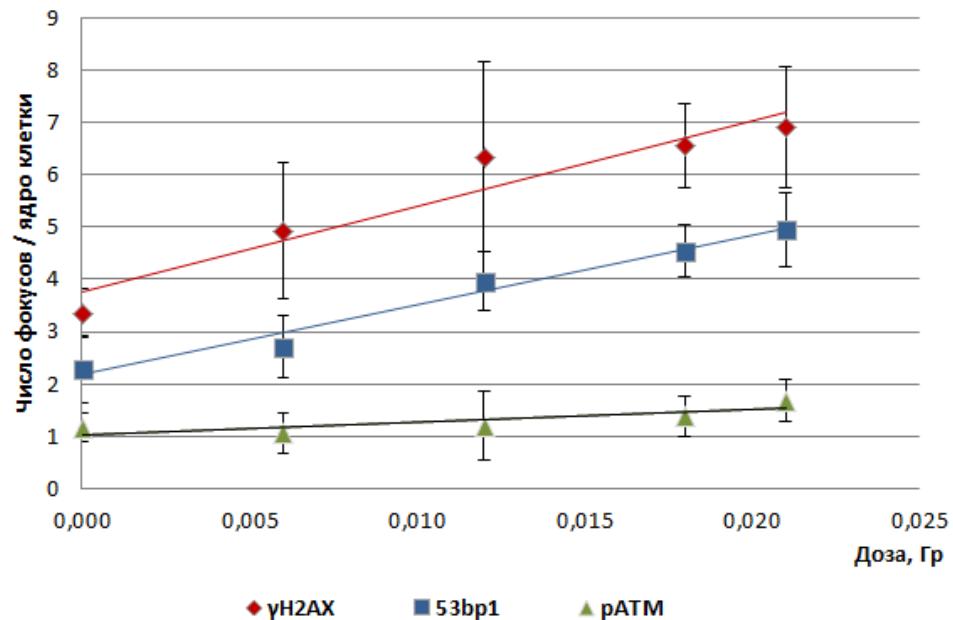


Рисунок 20 – Изменение среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM в зависимости поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с НТО

Линейные зависимости от полученной дозы НТО за 24 ч (значения х в Гр)

$\gamma$ H2AX:  $y = (165 \pm 31)x + (3,7 \pm 0,9)$  ( $R^2 = 0,92$ );

53BP1:  $y = (132 \pm 13)x + (2,2 \pm 0,4)$  ( $R^2 = 0,98$ );

pATM:  $y = (24 \pm 7)x + (1,0 \pm 0,2)$  ( $R^2 = 0,70$ ).

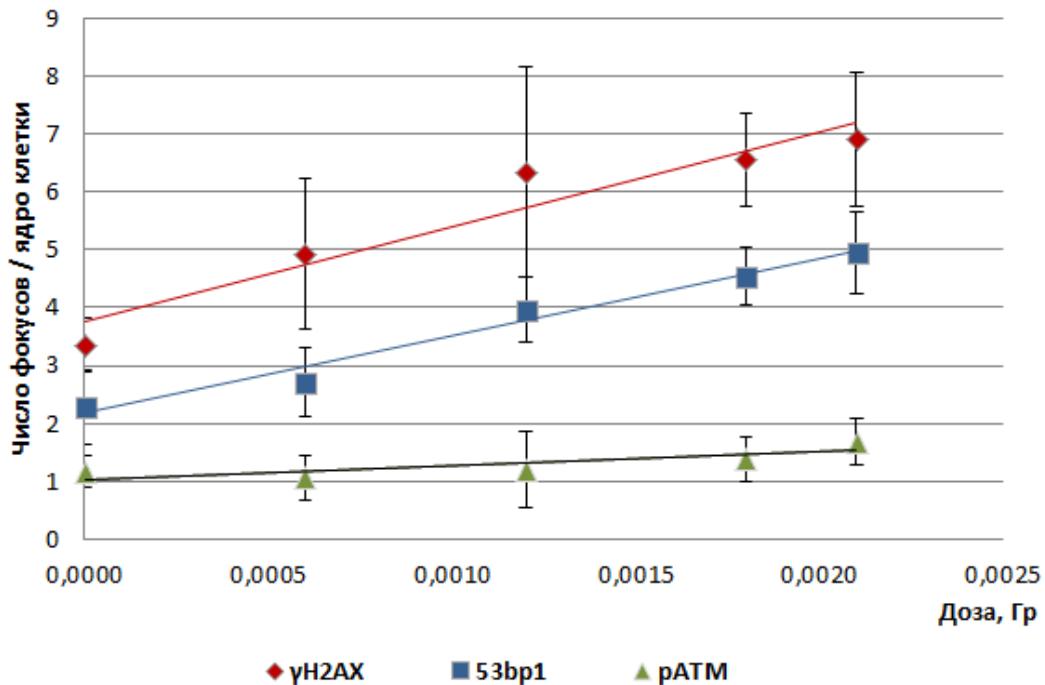


Рисунок 21– Изменение среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM в зависимости «остаточной» поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с НТО

Линейные зависимости от полученной «остаточной» дозы НТО (значения х в Гр)

$\gamma$ H2AX:  $y = (1662 \pm 384)x + (3,9 \pm 1,0)$  ( $R^2 = 0,86$ );

53BP1:  $y = (1365 \pm 174)x + (2,3 \pm 0,4)$  ( $R^2 = 0,95$ );

pATM:  $y = (263 \pm 77)x + (1,0 \pm 0,2)$  ( $R^2 = 0,80$ ).

В изученном диапазоне объемной радиоактивности зависимость изменений количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1, pATM от объемной радиоактивности  ${}^3$ Н-тимицина и НТО хорошо описывается линейным приближением  $y = b + ax$ , где у – количество фокусов в клеточном ядре, а х – объемная радиоактивность (МБк/л)

или поглощенная доза ядром клетки (Гр и мГр). При описании дозовых зависимостей линейными уравнениями угловой коэффициент  $a$  отражает прирост эффекта на единицу дозы. Сравнение угловых коэффициентов  $a$  двух дозовых зависимостей, полученных для разных типов воздействий, показывает насколько одно из них эффективнее другого.

Комплексное представление среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM при инкубации с  $^{3}\text{H}$ -тимидином и НТО показано на рисунке 22, соответствующие коэффициенты линейной зависимости от активности в среде в таблице 5. На рисунках 23 и 24 представлено изменение среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM в зависимости от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч и от «остаточной» дозы (в скобках) при инкубации с  $^{3}\text{H}$ -тимидином и НТО, соответствующие коэффициенты линейной зависимости от поглощенных доз в таблицах 6 и 7.

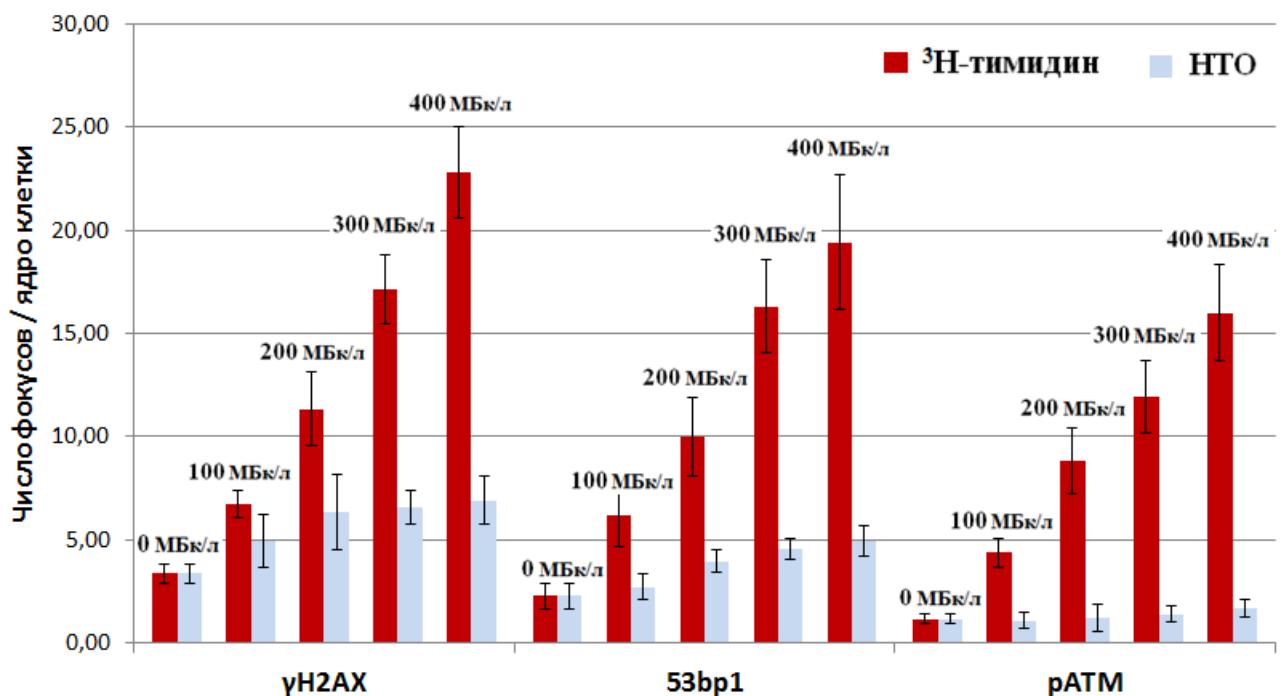


Рисунок 22 – Количество фокусов в ядрах МСК от радиоактивности в среде с  $^{3}\text{H}$ -тимидином и НТО

Таблица 5 – Коэффициенты линейной зависимости количества фокусов от радиоактивности в среде (МБк/л) с  $^{3}\text{H}$ -тимидином и НТО

Фокусы	3Н-тимидин		НТО	
	a	b	a	b
$\gamma\text{H2AX}$	0,049	2,4	0,0087	3,9
53BP1	0,044	2,0	0,0071	2,3
pATM	0,037	1,0	0,0014	1,0

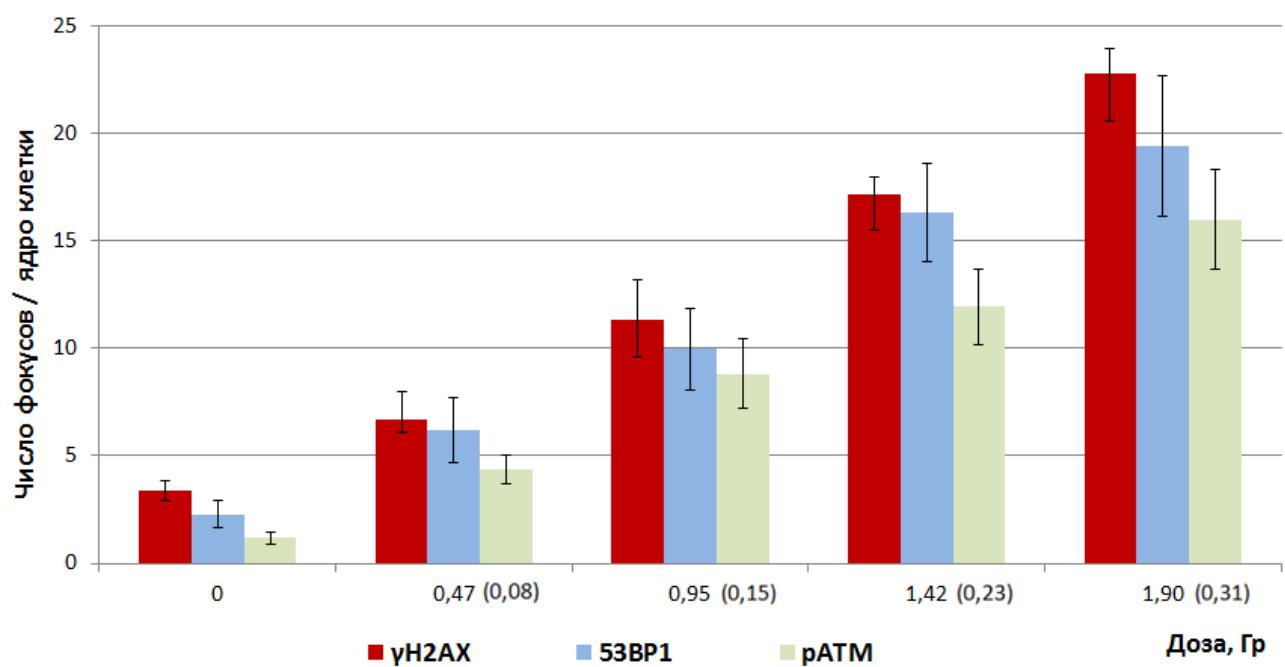


Рисунок 23 – Количество фокусов в ядрах МСК от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с  $^{3}\text{H}$ -тимидином

Таблица 6 – Коэффициенты линейной зависимости количества фокусов от поглощенной дозы (Гр) ядром МСК за 24 ч при инкубации с  $^{3}\text{H}$ -тимидином

Фокусы	Доза за 24 ч		Доза «остаточная»	
	a	b	a	b
$\gamma\text{H2AX}$	10,4	2,4	64,1	2,4
53BP1	9,3	2,0	57,6	2,0
pATM	7,8	1,0	48,3	1,0

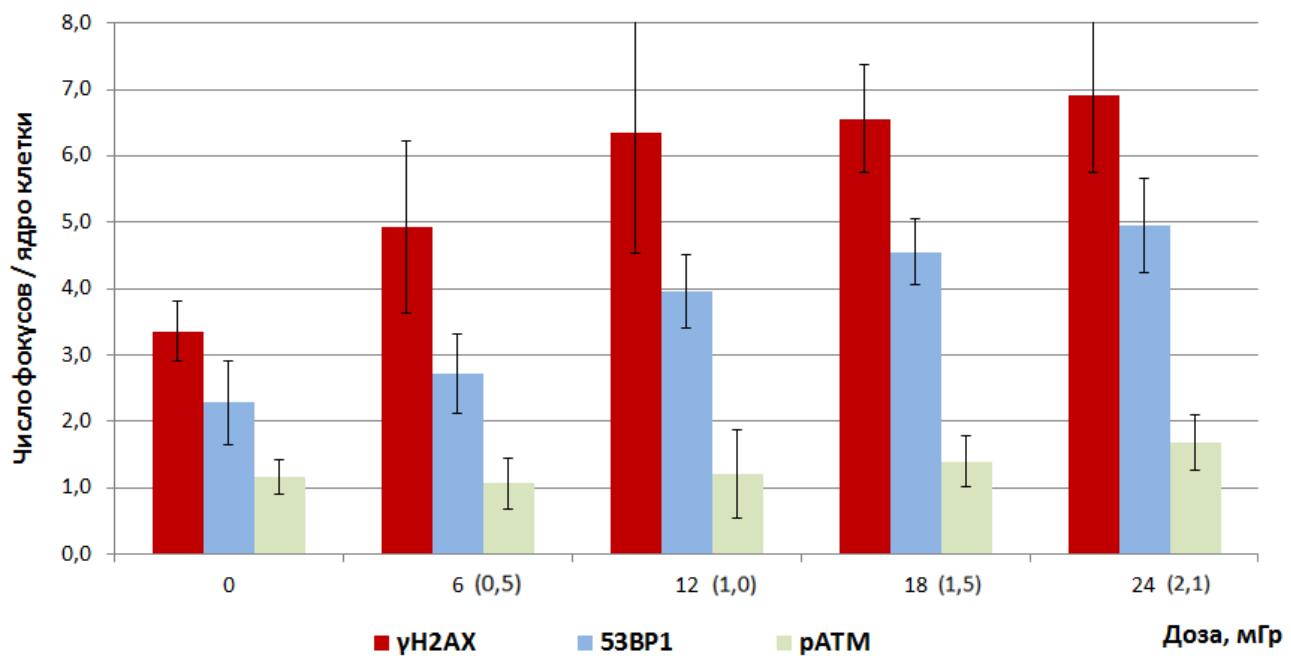


Рисунок 24 – Количество фокусов в ядрах МСК от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с НТО

Таблица 7 – Коэффициенты линейной зависимости количества фокусов от поглощенной дозы (Гр) ядром МСК за 24 ч при инкубации с НТО

Фокусы	Доза за 24 ч		Доза «остаточная»	
	a	b	a	b
$\gamma$ H2AX	165	3,7	1662	3,9
53BP1	132	2,2	1365	2,3
pATM	24	1,0	263	1,0

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что в диапазоне объемных радиоактивностей 100-400 МБк/л количественный выход фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1, pATM соответственно в 5,6; 6,2; 26,4 раза выше при воздействии  $^3$ H-тимицина, чем при воздействии НТО. Поглощенные дозы от  $^3$ H-тимицина превышают в 80 раз дозы от НТО при инкубации клеток с одинаковой объемной радиоактивностью в течение 24 ч, что обусловлено более высокой в 180 раз активностью  $^3$ H-тимицина в ядрах клеток, по сравнению с НТО по итогам 24 ч инкубации в среде. Поглощенные «остаточные» дозы от  $^3$ H-тимицина превышают в 150 раз «остаточные» дозы от НТО при тех же условиях.

#### 4.1.5 Анализ количества фокусов $\gamma$ H2AX, в ядрах фибробластов легкого человека (MRC-5), инкубированных с $^3$ H-тимидином и $^3$ H-аминокислотами

С целью сравнительного анализа повреждений ДНК было проведено исследование по определению количества фокусов  $\gamma$ H2AX, в ядрах фибробластов легкого человека (MRC-5), инкубированных с  $^3$ H-тимидином и  $^3$ H-аминокислотами. Эксперименты по сравнительному количественному анализу фокусов  $\gamma$ H2AX, как маркеров ДР ДНК, в клетках MRC-5 при 24 ч инкубации как с  $^3$ H-тимидином, так и с тритированными аминокислотами ( $^3$ H-глицином,  $^3$ H-аланином,  $^3$ H-пролином) с различной объемной радиоактивностью, позволили установить, что зависимость количества фокусов  $\gamma$ H2AX от радиоактивности в культуральной среде описывается линейными уравнениями. После 24 ч облучения в диапазоне от 100 до 400 МБк/л наблюдается увеличение количества фокусов  $\gamma$ H2AX у всех соединений (рисунок 25-27). Зависимости «активность-эффект» хорошо аппроксимируются линейными уравнениями, где  $y$  – количество фокусов,  $x$  – радиоактивность в МБк/л.

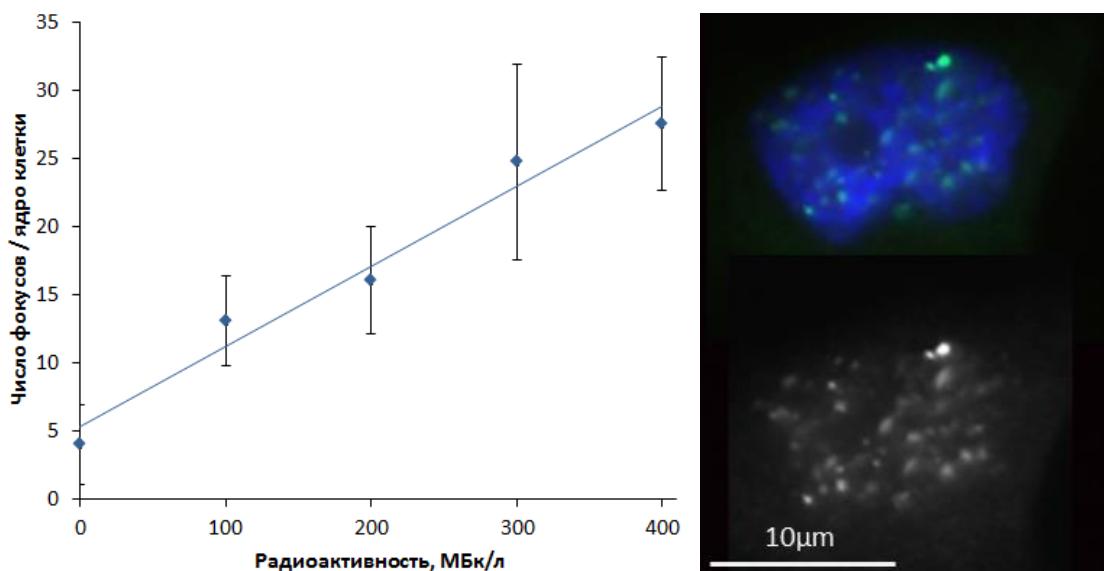


Рисунок 25 – Зависимости образования фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках MRC-5 от объемной радиоактивности  $^3$ H-тимицина

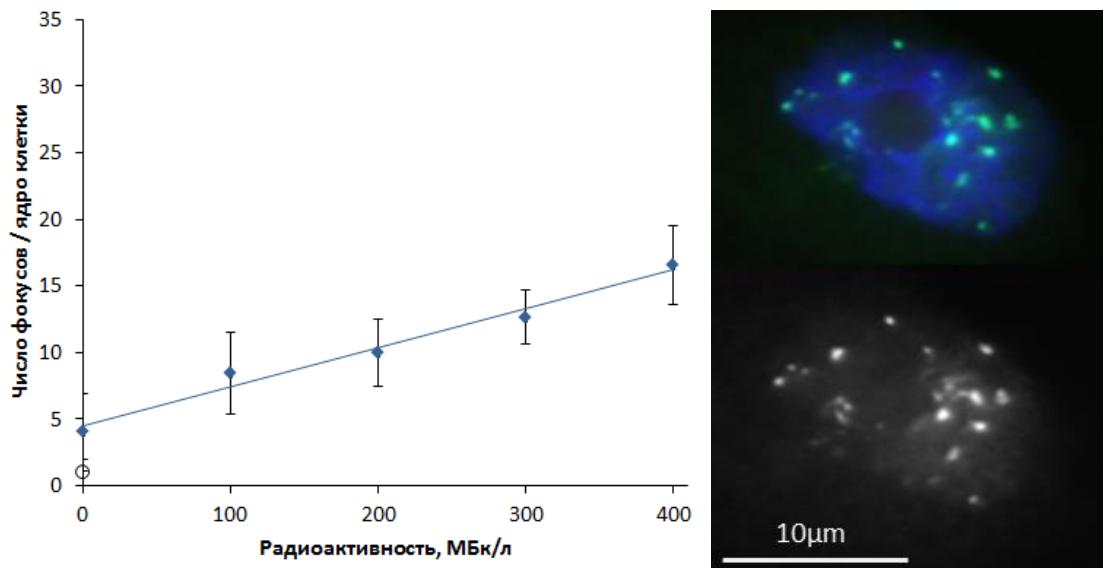


Рисунок 26 – Зависимости образования фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках MRC-5 от объемной радиоактивности  $^3\text{H}$ -аланина

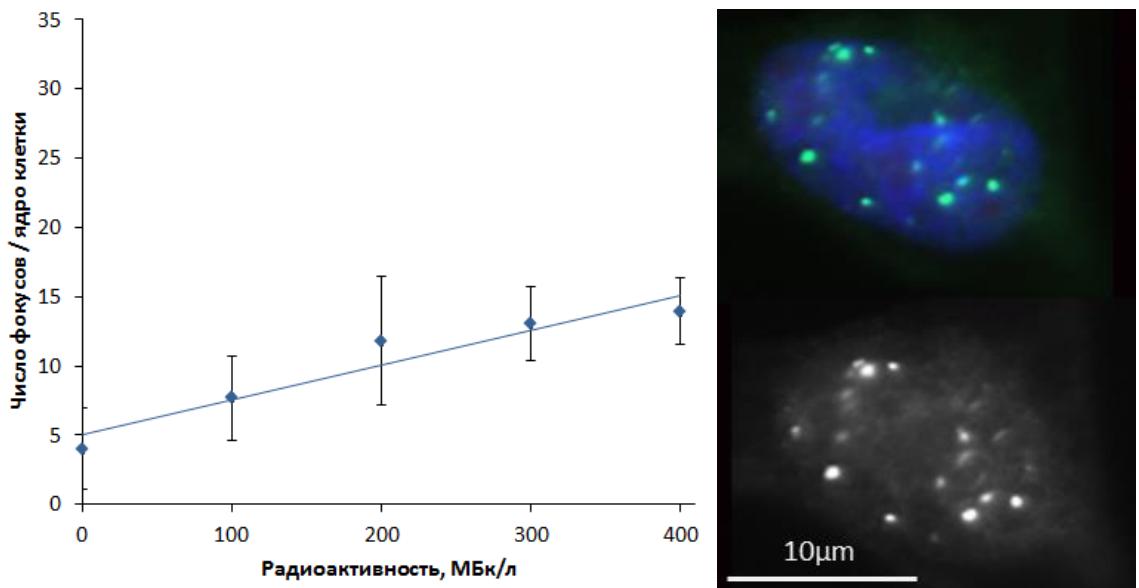


Рисунок 27 – Зависимости образования фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках MRC-5 от объемной радиоактивности  $^3\text{H}$ -глицина

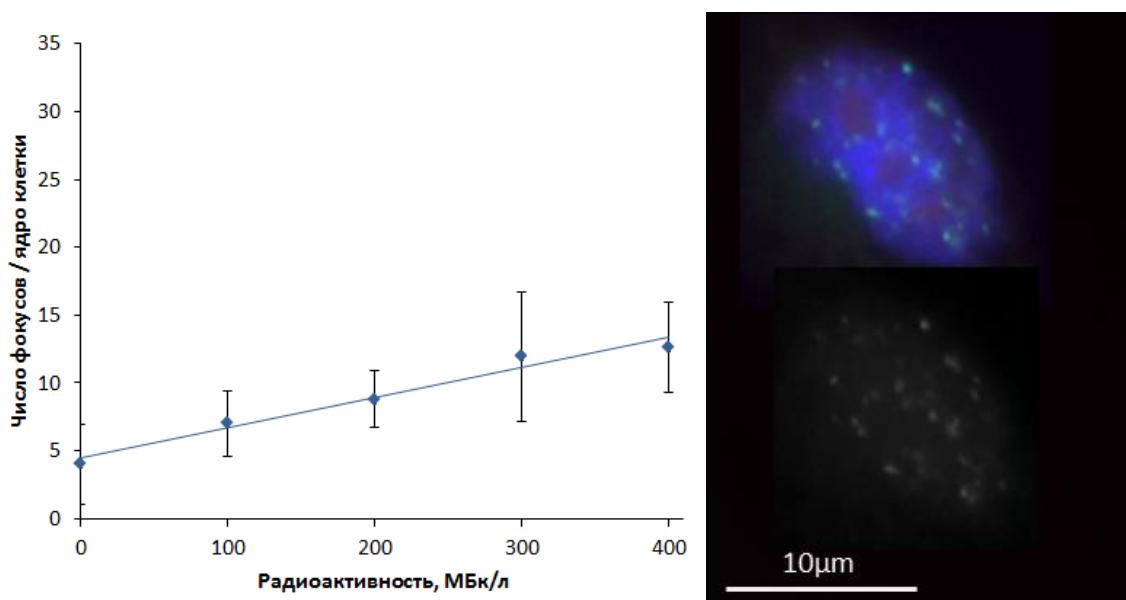


Рисунок 28 – Зависимости образования фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках MRC-5 от объемной радиоактивности  $^3$ H-пролина

Линейные зависимости количества фокусов  $\gamma$ H2AX в клеточном ядре от активности соединений с тритием в среде (МБк/л)

$$^3\text{H-тимидин: } y = (0,059 \pm 0,006)x + (5,3 \pm 3,0) \quad (R^2 = 0,97);$$

$$^3\text{H-аланин: } y = (0,029 \pm 0,003)x + (4,5 \pm 1,3) \quad (R^2 = 0,98);$$

$$^3\text{H-глицин: } y = (0,025 \pm 0,004)x + (5,1 \pm 2,1) \quad (R^2 = 0,92);$$

$$^3\text{H-пролин: } y = (0,022 \pm 0,002)x + (4,4 \pm 1,1) \quad (R^2 = 0,97).$$

На рисунке 29 представлены количественные данные фокусов  $\gamma$ H2AX в клеточном ядре в зависимости объемной радиоактивности  $^3$ H-тимицина и  $^3$ H-аминокислот, а коэффициенты линейной зависимости в таблице 8.

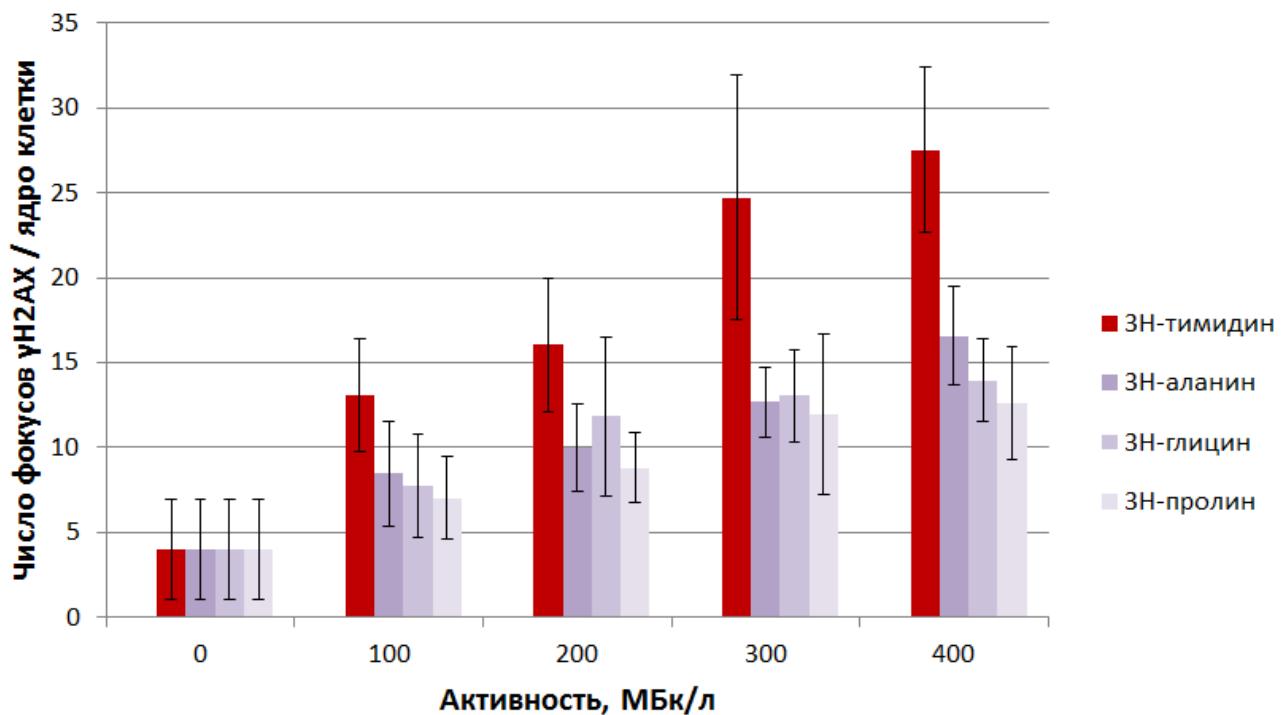


Рисунок 29 – Количество фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках MRC-5 в зависимости объемной радиоактивности  $^3$ H-тимидина и  $^3$ H-аминокислот

Таблица 8 – Коэффициенты линейной зависимости у фокусов  $\gamma$ H2AX от радиоактивности в среде (МБк/л)

$^3$ H-тимидин		$^3$ H-аланин		$^3$ H-глицин		$^3$ H-пролин	
a	b	a	b	a	b	a	b
0,059	5,3	0,029	4,5	0,025	5,1	0,022	4,4

Сравнение линейных угловых коэффициентов с помощью Z-теста показало статистически достоверные различия между количественным выходом ДР ДНК в клетках при инкубации их в среде, содержащей  $^3$ H-тимидин или меченные тритием -глицин, -аланин, -пролин ( $p<0,001$ ,  $z=4,5$ ;  $4,47$ ;  $5,66$  соответственно). В целом в пересчете на единицу объемной радиоактивности  $^3$ H-тимидин вызывает более чем в 2 раза большее количество фокусов ДР ДНК, чем меченные тритием аминокислоты.

При сравнении зависимостей изменения количества фокусов в клетках, инкубированных в среде с мечеными аминокислотами, значимые различия выявлены между эффектами в клетках, инкубированных в среде, содержащей  $^3$ H-

мечены аланин и пролин ( $z=2,1$ ,  $p=0,02$ ). После инкубации клеточной культуры с  $^3\text{H}$ -аланином количественный выход ДР ДНК был на 30% выше, по сравнению с  $^3\text{H}$ -пролином. Достоверных различий между количественным выходом ДР при инкубации клеток с  $^3\text{H}$ -меченным глицином и  $^3\text{H}$ -аланином выявлено не было.

Сравнение зависимостей образования фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках МСК и MRC-5 от объемной радиоактивности  $^3\text{H}$ -тимицина (рисунок 16 и 25) показывает близкую их динамику. Это обусловлено сопоставимыми значениями параметров MRC-5 и МСК костного мозга человека как в отношении форм и размеров их ядер и клеток, так и в отношении пролиферативной активности. Эти параметры в совокупности определяют поглощенную дозу этими клетками, размер которой будет также сопоставимым у клеток MRC-5 и МСК. Несколько более высокие значения фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в MRC-5, по сравнению с МСК можно объяснить небольшой разницей в количестве клеток в культуральной среде и скоростью их пролиферации.

#### 4.1.6 Сравнительный анализ эффектов в ядрах клеток в зависимости от молекулярного состава хроматина

Наибольший вклад в поглощенную дозу и повреждения ДНК от излучения возникает от распада трития в ядре клетки. Тритий включается в состав ДНК и белки в ядрах, в основном находящиеся в составе хроматина. Известно, что  $^3\text{H}$ -тимицин включается в структуру ДНК только при синтезе молекулы, то есть во время процессов репликации ДНК в S-фазе (фаза синтеза ДНК) клеточного цикла. Включение аминокислот при синтезе белков хроматина в большинстве типов клеток (за исключением эмбриональных) также ограничивается S-фазой [54].

Значительную часть ядерных белков составляют гистоны. Выделяют пять основных типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 входят в состав белковой глобулы минимальной нуклеосомы. Помимо гистонов в ядре присутствуют негистоновые белки. В широком смысле, в эту группу следует включить все белки ядра, кроме гистонов, в том числе структурные белки, ферменты, белки, участвующие в регуляции транскрипции и репликации и т.д.

Негистоновые белки, непосредственно участвующие в формировании хроматиновых фибрилл, составляют HMG-белки. Наиболее широко из группы HMG-белков в хроматине представлен белок HMGB (~90%). Известно, что в среднем 1 молекула белка группы HMGB приходится на 10-15 нуклеосом [138].

Современные открытые базы данных белков, в которых представлена их аминокислотная структура, позволяют оценить количество и молярную массу гистонов и отдельных негистоновых белков, входящих в хроматин ядра клетки.

Количественный состав аминокислот гистонов H1, H2A, H2B, H3, H4 для *Homo sapiens* оценивался на данных сайта Национального центра биотехнологической информации США (источник: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/HistoneDB2.0/>).

Для негистонового белка HMGB1 расчет основан на данных сайта открытой базы данных последовательностей белков UniProt (источник: <https://www.uniprot.org/uniprot/P09429>).

Сравнительный количественный состав аминокислот гистонов H1, H2A, H2B, H3, H4 и негистонового белка HMGB, приходящихся на 10 нуклеосом, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Аминокислотный состав белков (гистоны и негистоновый белок HMGB) и состав тимидина в хроматине

Название	Молярная масса (ММ) молекулы, г/моль	Количество на 10 нуклеосом	Количественный состав	ММ на 10 нуклеосом, г/моль	Молярная масса
Тимидин	242	880	7,2%	213162	13,7%
Аланин	89	1359	11,1%	120951	7,7%
Цистеин	121	23	0,2%	2783	0,2%
Аспарагиновая кислота	133	329	2,7%	43757	2,8%
Глутаминовая кислота	147	597	4,9%	87759	5,6%
Фенилаланин	165	199	1,6%	32835	2,1%
Глицин	75	981	8,0%	73575	4,7%
Гистидин	155	203	1,7%	31465	2,0%
Изолейцин	131	634	5,2%	83054	5,3%
Лизин	146	1773	14,5%	258858	16,6%
Лейцин	131	984	8,0%	128904	8,3%

## Продолжение таблицы 9

Название	Молярная масса (ММ) молекулы, г/моль	Количество на 10 нуклеосом	Количественный состав	ММ на 10 нуклеосом, г/моль	Молярная масса
Метионин	149	196	1,6%	29204	1,9%
Аспарагин	132	404	3,3%	53328	3,4%
Пролин	115	503	4,1%	57845	3,7%
Глутамин	146	342	2,8%	49932	3,2%
Аргинин	174	1050	8,6%	182700	11,7%
Серин	105	841	6,9%	88305	5,7%
Треонин	119	705	5,8%	83895	5,4%
Валин	117	745	6,1%	87165	5,6%
Триптофан	204	2	0,0%	408	0,0%
Тирозин	181	357	2,9%	64617	4,1%

Несмотря на то, что количество тимидина в хроматине в процентном отношении меньше (или столько же) чем у ряда аминокислот (аланин, глицин, лизин, лейцин, аргинин), повреждения ДНК и сопутствующие эффекты от  $^3\text{H}$ -тимидина существенно выше, чем от  $^3\text{H}$ -аминокислот. Это объясняется тем, что меченные тритием аминокислоты будут распределены в белках по всей клетке, а меченный тритием тимидин будет концентрироваться в основном в ДНК ядер клетки. Сравнительный анализ количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , в ядрах фибробластов лёгкого человека (MRC-5) при воздействии  $^3\text{H}$ -аминокислот показал, что наибольшее количество ДР ДНК формируется в тех клеточных культурах, которые инкубировались в среде с добавлением  $^3\text{H}$ -аланина, среднее с  $^3\text{H}$ -глицином наименьшее количество с  $^3\text{H}$ -пролином. Эти экспериментальные данные подтверждаются оценками сравнения количественного аминокислотного состава белков хроматина аланин (11,1%), глицин (8,0%) и пролин (4,1%). Можно предположить, что клеточные ядерные эффекты действия  $^3\text{H}$ -аминокислот зависят от их количественного состава в хроматине. Данный вывод подтверждается более ранними исследованиями выживаемости и мутагенных эффектов в лимфоцитарных лейкозных клеток мышей (L5178Y) [47], в которых отмечен наибольший эффект от  $^3\text{H}$ -аргинина, с последовательным снижением у  $^3\text{H}$ -лизина,  $^3\text{H}$ -лейцина и  $^3\text{H}$ -аспарагиновой кислоты. За исключением  $^3\text{H}$ -аргинина,

последовательность понижения эффектов выживаемости и мутации соответствует изменению количественного состава этих аминокислот в хроматине (таблица 9).

#### 4.2 Результаты радиобиологических экспериментов на крысах *in vivo*

С целью определения степени воздействия на клетки тканей органов млекопитающих при хроническом потреблении тритированных соединений проводились радиобиологические эксперименты *in vivo* на крысах в течение 28-30 дней при ежедневном приеме НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина в растворе питьевой воды. При хроническом поступлении с питьем НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина с небольшой объемной активностью 200 кБк/л в организм крыс были получены следующие оценки и результаты измерений:

- оценки радиоактивности в органах и биологических жидкостях организма крыс;
- значения количества фокусов репарации ДР ДНК  $\gamma$ H2AX в спленоцитах крыс;
- значения ПХЭ костного мозга с микроядрами.

##### 4.2.1 Оценка радиоактивности в тканях органов крыс при пероральном приеме растворов с $^3\text{H}$ -тимицином и НТО

Потребляемая крысами питьевая вода с тритированными соединениями имела измеренную объемную активность трития соответственно  $194 \pm 16$  кБк/л с НТО и  $209 \pm 23$  кБк/л с  $^3\text{H}$ -тимицином.

Ежедневно каждая крыса выпивала в среднем по  $43 \pm 8$  мл жидкости, что соответствует  $8,3 \pm 1,3$  кБк для НТО и  $9,0 \pm 2,7$  кБк для  $^3\text{H}$ -тимицина. Измерение суточного количества выпиваемых крысами растворов, содержащих соединения трития, показывает, что радионуклид поступал в организм крыс равномерно. Суммарная активность трития, поступившая в организм к концу эксперимента, составила 253,2 кБк для группы «НТО» и 259,7 кБк для группы « $^3\text{H}$ -тимицин».

Принимая во внимание отношение удельной активности в различных тканях к объемной активности НТО в питьевой воде (рисунок 9) определяется удельная активность в тканях крыс (рисунок 30).

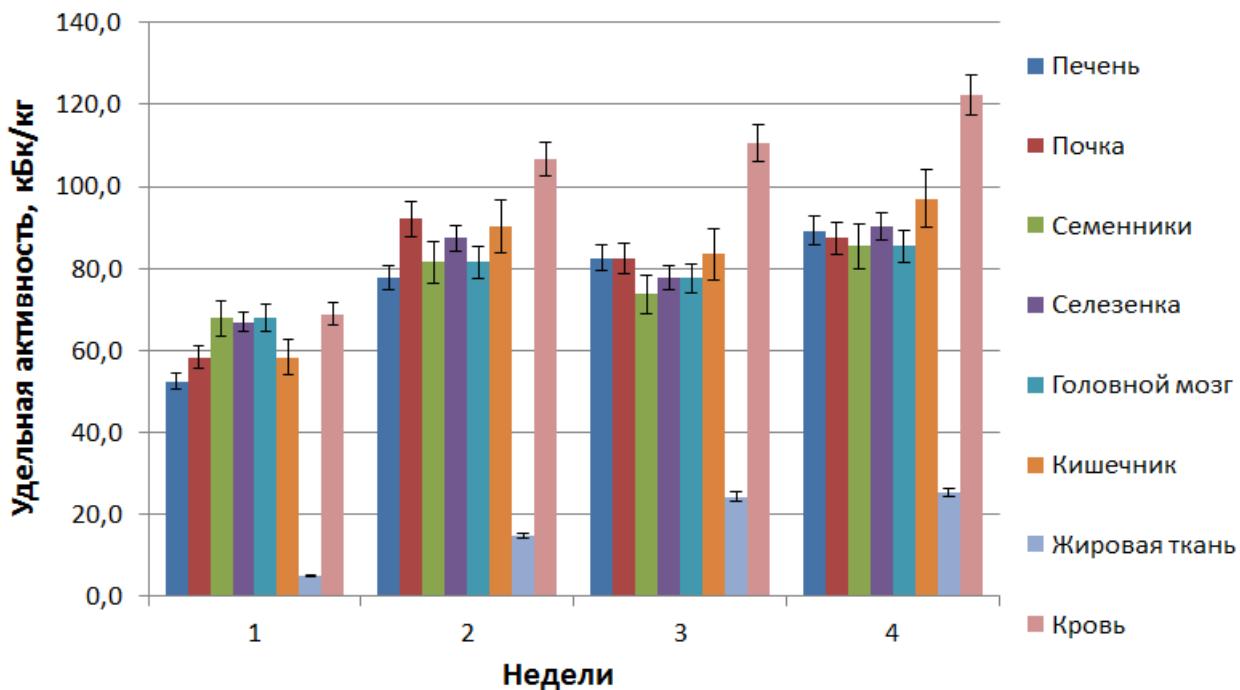


Рисунок 30 – Оценка удельной активности в тканях крыс за 4 недели при потреблении НТО в питьевой воде с активностью 194 кБк/л

Принимая также во внимание коэффициенты пересчета для удельной активности  $^3\text{H}$ -тимицина по отношению к НТО (рисунок 10) получим оценку удельной активности  $^3\text{H}$ -тимицина в тканях крыс (рисунок 31).

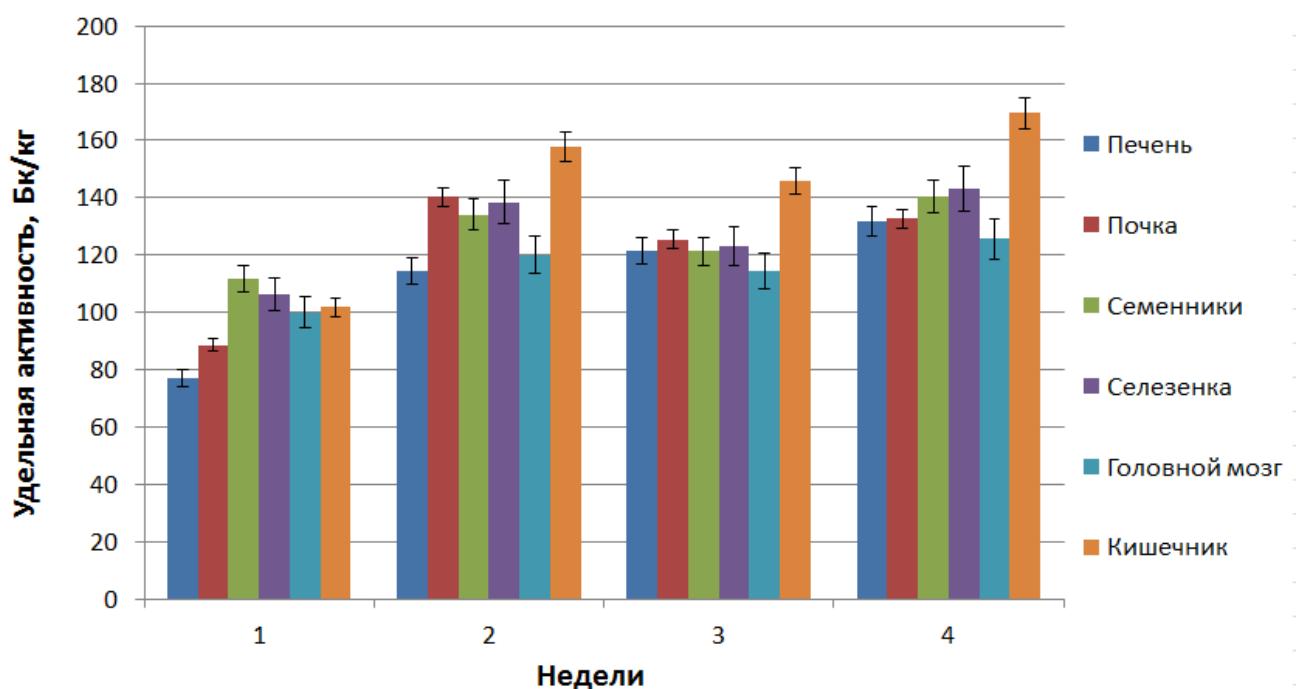


Рисунок 31 – Оценка удельной активности в тканях крыс за 4 недели при потреблении  $^3\text{H}$ -тимицина в питьевой воде с активностью 209 кБк/л

Используя стандартную формулу (2) для равномерного распределения изотопа в ткани можно провести соответствующую оценку полученных доз в различных тканях крыс, которая представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Расчетные значения мощности дозы в мкГр/ день НТО (194 кБк/л) и  $^{3}\text{H}$ -тимидина (209 кБк/л) в тканях крыс (в последних строках таблицы суммарные значения доз за 4 недели в мкГр)\*

Соединение	Орган крысы					
	Печень	Почка	Семенники	Селезенка	Головной мозг	Кишечник
1 неделя						
НТО	4,1	4,6	5,3	5,3	5,3	4,6
$^{3}\text{H}$ -тимидин	6,1	7,0	8,8	8,4	7,9	8,0
2 неделя						
НТО	6,1	7,3	6,4	6,9	6,4	7,1
$^{3}\text{H}$ -тимидин	9,0	11,0	10,6	10,9	9,4	12,4
3 неделя						
НТО	6,5	6,5	5,8	6,1	6,1	6,6
$^{3}\text{H}$ -тимидин	9,6	9,9	9,5	9,7	9,0	13,3
4 неделя						
НТО	7,0	6,9	6,7	7,1	6,7	7,6
$^{3}\text{H}$ -тимидин	10,4	10,5	11,1	11,3	9,9	13,3
Всего суммарно за 4 недели						
НТО	166,2	176,3	169,9	177,4	172,1	181,2
$^{3}\text{H}$ -тимидин	245,1	268,3	279,6	281,5	253,3	329,8

\* стандартное отклонение не превышает 10% от значений в таблице

Полученные значения доз для НТО коррелируют со значениями доз, полученных в работе [72] при потреблении НТО с питьевой водой мышами и сопоставимой низкой активностью трития. В случае равномерного распределения НТО можно оценить число распадов трития на одно ядро клетки в ткани. При объемной активности НТО в 100 кБк/л число распадов на одно ядро клетки диаметром 8 мкм составит всего 0,0001 распада в день (один распад на 10000 клеток). Аналогичная по величине оценка представлена в [72].

Расчетные значения доз с использованием стандартной формулы очень малы, поэтому клеточные эффекты должны либо отсутствовать, либо проявляться

только в отдельных клетках тканей. В случае НТО, тритий распределяется с водой равномерно по всей ткани органа, но на клеточном уровне пораженных ионизирующими излучением клеток будет относительно немного. В случае  $^3\text{H}$ -тимицина тритий будет концентрироваться в ядрах клеток, поэтому клеточных эффектов в ткани должно быть большее количество.

#### 4.2.2 Анализ количества фокусов $\gamma\text{H2AX}$ в ядрах спленоцитов селезенки крыс при пероральном приеме растворов с $^3\text{H}$ -тимицином и НТО

Из ткани селезенки проводилось выделение спленоцитов, в отношении которых проводилось иммуноцитохимическое окрашивание и визуализация микроизображений на люминесцентном микроскопе. Проводился подсчет количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в клетках селезенки крыс каждой группы. Результаты представлены как средние значения количества фокусов на ядро клетки. Соответствие полученных показателей распределению Пуассона по критерию  $\chi^2$  не выявлено, поэтому межгрупповые сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни.

Как НТО, так и  $^3\text{H}$ -тимицин по сравнению с контролем вызывают статистически значимое небольшое увеличение количества повреждений ДНК. Также выявлены статистически значимые различия между группами «НТО» и « $^3\text{H}$ -тимицин». Соответствующие значения представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Распределение количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в спленоцитах крыс

Количество фокусов	Клетки с НТО	Клетки с $^3\text{H}$ -тимицином	Контроль
0	7082	8022	10184
1	148	357	131
2	122	235	94
3	80	167	69
4	36	94	42
5	33	75	22
6	30	37	12
7	12	19	7

## Продолжение таблицы 12

Количество фокусов	Клетки с НТО	Клетки с $^3\text{H}$ -тимидином	Контроль
Относительное число клеток с фокусами			
0,06	0,11	0,04	
Среднее количество фокусов на клетку			
0,16	0,27	0,09	
Стандартная ошибка среднего			
0,01	0,01	0,01	

Проведенное исследование показало, что при одинаковой объемной активности трития в потребляемой воде, равной 200 кБк/л, радиоактивные соединения с тритием довольно слабо влияют на ДНК спленоцитов крыс. Более существенное воздействие оказывает  $^3\text{H}$ -тимидин по сравнению с НТО. Количество клеток с фокусами у НТО почти такое же, как и в случае отсутствия радиоактивности, а среднее число фокусов на клетку почти в два раза меньше, чем у тимицина. Большее число фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  (и соответственно ДР ДНК) объясняется большим накоплением  $^3\text{H}$ -тимицина исключительно в ядре клетки, что определяет соответственно большую поглощенную дозу в ядре. Исследование фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  показало небольшое число пораженных клеток по сравнению с общим количеством спленоцитов. Существенная часть фокусов не относится к воздействию трития и связана с разрывами ДНК от других причин.

Оценка дозиметрии в случае слабой радиоактивности трития не может быть проведена с учетом применяемых дозиметрических методов. В связи с тем, что тритий будет содержаться в относительно небольшом проценте клеток ткани, число распадов трития будет подчиняться распределению Пуассона в случае однородного распределения НТО. Фактически, в пораженных клетках за исследуемый период произойдет только один распад трития, в связи с чем, поглощенные клетками дозы будут определяться соответствующими S-значениями моноэнергетических электронов с энергией от 0 до 18 кэВ с учетом размеров ядер клеток спленоцитов (диаметр 8-10 мкм). Как видно из графиков на рисунках 4, 5 и значений в таблице 2 максимальные значения поглощенных ядрами клеток доз не будут превышать 5 мГр.

#### 4.2.3 Цитогенетический эффект соединений трития у крыс при пероральном приеме растворов с $^{3}\text{H}$ -тимидином и НТО

В экспериментах по анализу ПХЭ костного мозга крыс питьевая вода, содержала тритий в органической и неорганической форме, с близкой радиоактивностью приблизительно 200 кБк/л и 800 кБк/л в сутки. Анализ ПХЭ костного мозга при 800 кБк/л трития в питьевой воде крыс представлен в [68]. Результаты экспериментов по исследованию ПХЭ с микроядрами представлены на рисунке 32 и таблице 13.

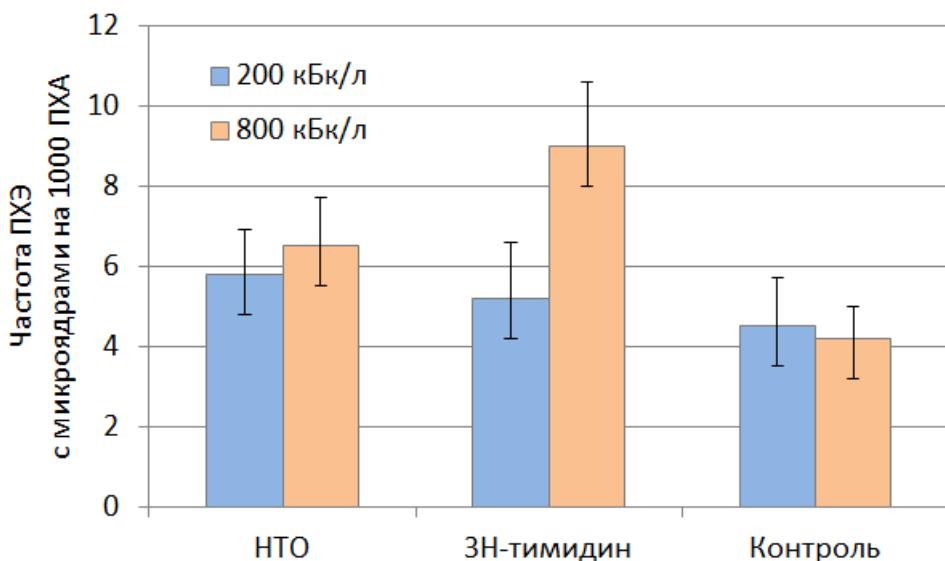


Рисунок 32 – Частота ПХЭ с микроядрами на 28 и 30 сутки воздействия трития с питьевой водой активностью 200 кБк/л и 800 кБк/л в сутки

Таблица 13 – Генотоксический эффекты ПХЭ костного мозга крыс при приеме питьевой воды с НТО и  $^{3}\text{H}$ -тимидином активностью 200 кБк/л и 800 кБк/л в сутки

Группа	Эффект $M \pm \sigma^{**}$			
	Частота ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ		Доля ПХЭ от суммы всех эритроцитов	
	200 кБк/л	800 кБк/л	200 кБк/л	800 кБк/л
НТО	5,8±1,1	6,5±1,2	0,35±0,02	0,44±0,02
$^{3}\text{H}$ -тимидин	5,2±1,4	9,0±1,6*	0,39±0,02	0,47±0,03
Контроль	4,5±1,2	4,2±0,8	0,35±0,04	0,45±0,03

\* Отличие от контрольной группы по критерию  $\chi^2$  статистически значимы при  $P \leq 0,05$

\*\*  $M \pm \sigma$  – среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение

Микроядерный тест используется как показатель генотоксического эффекта соединений трития. Установлено изменение средних значений доли ПХЭ в пределах 32-39% при активности 200 кБк/л и 44-47% при активности 800 кБк/л. Средняя частота ПХЭ с микроядрами у крыс из контрольной группы составила  $4,5 \pm 1,2\%$  и  $4,2 \pm 0,8\%$ . В группах крыс, которые пили воду с содержанием трития в виде НТО и  $^3\text{H}$ -тимицина, частота ПХЭ с микроядрами составила при 200 кБк/л соответственно  $5,8 \pm 0,9\%$  и  $5,2 \pm 0,7\%$ , а при 800 кБк/л соответственно  $6,5 \pm 1,2\%$  и  $9,0 \pm 1,6\%$ . Различия по критерию  $\chi^2$  между контрольной и экспериментальными группами, а также экспериментальными группами между собой статистически незначимы при активности питьевой воды 200 кБк/л, а при активности 800 кБк/л статистическая значимость выявлена только между контрольной и экспериментальной группой с  $^3\text{H}$ -тимицином.

#### 4.3 Обсуждение результатов исследований с тритием

Эксперименты по сравнительному количественному анализу фокусов маркеров ДР ДНК  $\gamma$ H2AX, 53BP1, pATM при инкубации МСК с  $^3\text{H}$ -тимицином и НТО, а также анализу фокусов  $\gamma$ H2AX при 24 ч инкубации клеток MRC-5 с  $^3\text{H}$ -тимицином и с  $^3\text{H}$ -аминокислотами ( $^3\text{H}$ -глицином,  $^3\text{H}$ -аланином,  $^3\text{H}$ -пролином), позволили установить, что зависимости количества фокусов от объемной радиоактивности и поглощенной дозы ядром клеток описываются линейными уравнениями в диапазоне радиоактивности 100-400 МБк/л.

Определение радиоактивности в клетках и оценка поглощенных доз ядрами клеток в экспериментах с соединениями с тритием, показывает, что существенная разница в клеточных эффектах от воздействия этих молекулярных соединений в основном зависит от степени их содержания в ядре клетки.

Проведенные экспериментальные исследования показывают различное количество фокусов  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и pATM в ядрах МСК, что объясняется их разной функцией в молекулярных механизмах путей репарации ДР ДНК. Кинетика восстановления ДР ДНК определяет конечное значение количества фокусов при длительном облучении тритием в течение 24 ч. Несмотря на то, что

доза от  $^3\text{H}$ -тимицина, полученная ядрами клеток за 24 ч довольно высокая, основное количество фокусов определяется дозой, полученной только в последние 4 часа инкубации. Активное включение  $^3\text{H}$ -тимицина в ДНК по сравнению с НТО является основным фактором разницы радиоактивности в ядрах клеток (в 80 раз) и в количестве белков-маркеров репарации ДР ДНК (примерно в 6 раз у  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1).

Проведенные экспериментальные измерения активности трития с НТО и  $^3\text{H}$ -тимицином в ядрах и клетках МСК коррелируют с данными экспериментов других аналогичных исследований [47, 113]. Измеренные значения активности НТО соответствуют предположению о равномерности распределения НТО в ядрах, клетках и среде. Близкие и достаточно высокие значения активности  $^3\text{H}$ -тимицина в ДНК и ядрах клеток (таблица 4) указывают на то, что  $^3\text{H}$ -тимицин в ядре активно включается почти исключительно в структуру ДНК.

Представляет интерес проведение сравнения количества фокусов белков репарации при инкубации с соединениями с тритием и фотонном рентгеновском и гамма-облучении (Х- и  $\gamma$ -излучения). Такое сравнение можно проводить в случаях разного излучения только при одинаковых поглощенных дозах. В таблице 14 представлены угловые коэффициенты линейной аппроксимации при воздействии фотонного излучения в зависимости от поглощенной дозы ядрами клеток человека разного вида (фибробласты кожи, эпителиальные клетки молочной железы MCF10A, МСК). Значения указанных коэффициентов соответствуют количеству фокусов на клетку при дозе излучения в 1 Гр. Значения в таблице 14 представлены для количества фокусов через 30 мин после окончания фотонного облучения.

Таблица 14 – Угловые коэффициенты линейной аппроксимации при облучении фотонным излучением в зависимости от поглощенной дозы (фибробласты кожи, МСК человека, MCF10A эпителиальные клетки молочной железы А, НТ-1080 фиброзаркомы человека)

Излучение	Х-лучи 100 кВ, 0,04 Гр/мин		$\gamma$ -лучи 0,03 Гр/мин	Х-лучи 160 кВ	$\gamma$ -лучи 3,5 Гр/мин
	Клетки	Фибробласты кожи		МСК	
Публикация	[139]	[140]	[141]	[142]	[143]
Доза, Гр	0,1-1 Гр	0,1-1 Гр	0,1-1 Гр	0,1-0,3	0,1-1 Гр
$\gamma$ H2AX	30,8	34	33	21,6	-
53BP1	26,4	-	-	-	23,0*
pATM	20,9	-	32	16,1	18,3*

\* Оценочные значения из данных экспериментов

Значения количества фокусов  $\gamma$ H2AX (таблица 14) при рентгеновском облучении в диапазоне доз 0,1-1 Гр в разных исследованиях достаточно близки между собой, а также близки к результатам работы [145] (36 фокус / клетка / на 1 Гр в диапазоне доз до 2 Гр). Количество фокусов 53BP1, pATM при воздействии рентгеновского излучения несколько меньше, чем при воздействии гамма-излучения, что можно объяснить разницей в энергии фотонов, так как известно, что более низкоэнергетическое рентгеновское излучение вызывает большее количество повреждений ДНК [146]. Эффект образования фокусов от рентгеновского облучения превышает эффект от гамма-излучения примерно на 30%.

В указанных диапазонах доз значения фокусов при инкубации с  $^3$ Н-тимидином выше, чем у острого фотонного излучения в ~2 раза по отношению к рентгеновскому излучению (100-160 кВ) и ~3,0 к гамма-излучению. Этот факт можно объяснить тем, что появление низкоэнергетических электронов при распаде трития приводит к локально большему поглощению энергии субклеточными структурами по сравнению с Х- и гамма-излучением. Большее поглощение энергии субклеточными структурами приводит к большему количеству как ДР ДНК, так и к более сложным (комплексным) повреждениям

ДНК. Для представления среднего значения ОБЭ для малых доз в микродозиметрии используется коэффициент качества. Коэффициент качества определяется средним значением от энергий, содержащихся в малых фиксированных объемах в поле излучения (треках) частиц, и средней длиной хорды малого целевого объема. Фактически коэффициент качества является отношением линейных энергий (осредненных в поле излучения по дозе) исследуемого и эталонного излучений. В работе [12] проведен анализ литературных данных о средних дозовых распределениях в нано-масштабах (полученных на основе компьютерного моделирования методом Монте-Карло переноса излучения в веществе) и представлены значения коэффициентов качества трития по отношению к X- и гамма-излучению. В диапазоне субклеточных структур размером 0,3-1,0 мкм значения коэффициентов качества у трития оцениваются в 1,5-1,6 по отношению к X-излучению и в 2,8-3,4 к гамма-излучению, что соответствует наблюдаемым значениям сравнений фокусов белков репарации при соответствующих излучениях в диапазонах доз у  ${}^3\text{H}$ -тимицина и фотонного облучения (таблица 6 и таблица 14).

Настоящие экспериментальные исследования возникновения фокусов белков маркеров ДР ДНК показывают количественную иерархию фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, pATM (1,00:0,80:0,63) при «остаточной» дозе инкубации с  ${}^3\text{H}$ -тимицином за 24 ч, причем наблюдается непрерывное и линейное увеличение количества фокусов. При остром рентгеновском облучении (в том же диапазоне доз 100-500 мГр) фибробластов кожи человека соотношение количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, pATM несколько другое (через 0,5 ч 1,00:0,86:0,68, через 4 ч 1,00:0,91:0,85) [139]. В клетках МСК человека при остром рентгеновском облучении количество фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и pATM почти одинаково [141], а при остром гамма-излучении соотношение количества фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и pATM (1,00:0,66) [139] близко к соотношениям у  ${}^3\text{H}$ -тимицина. Значения отношений количества фокусов при одинаковой полученной дозе от острого рентгеновского облучения (2,5 мин) и от хронического облучения (24 ч)  ${}^3\text{H}$ -тимицином с учетом времени репарации ДР ДНК показывают меньшее относительное количество

фокусов 53BP1 и pATM при хроническом облучении, что можно объяснить репарацией по пути ГР в большей степени от  $^3\text{H}$ -тимицина, чем от рентгеновского облучения, так как  $^3\text{H}$ -тимицин включается в ДНК в S-фазе клеточного цикла.

Применение линейной аппроксимации данных на уровне низких доз (1-20 мГр) является некорректным при экстраполяции значений количества фокусов на более высокие диапазоны доз (свыше 0,1 Гр). Поэтому, сравнительный анализ воздействия НТО и фотонного излучения не проводился, в связи с очень низким полученным диапазоном доз (6-21 мГр за полные 24 ч и 0,6-2,1 мГр "остаточная" доза). Тем не менее, на основе работ по исследованию данных ответа на фотонное облучение в малых дозах и анализа механизмов эффективности репарации ДР ДНК можно объяснить полученные эффекты от трития при инкубации МСК с НТО. При инкубации МСК с НТО отмечается очень большая разница в количестве фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1 по отношению pATM, а также очень низкое число фокусов pATM, почти соответствующее эндогенному уровню. Воздействие малых доз (2,5-20 мГр) X-излучения (90 кВ) на образование фокусов систем репарации в фибробластах человека исследовалось в [147]. Процесс снижения фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и pATM при малых дозах (~10 мГр) в фибробластах человека сильно замедляется, а при дозе 2,5 мГр исчезновение фокусов уже не фиксируется. Исследования [148] показали, что если количество повреждений ДР ДНК мало, то белок-трансдуктор ATM не воспринимает сигнал о повреждениях и не активируется фосфорилированием, но при этом при малых дозах отмечается более высокое наличие сенсорного белка  $\gamma\text{H2AX}$  и белка-медиатора 53BP1 [147]. Полученные высокие значения коэффициентов линейной аппроксимации можно объяснить накоплением (за 24 часа инкубации с НТО) повышенного количества остаточных белков репарации ДНК  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1 из-за слабой репарации в диапазоне доз до 10 мГр, а очень низкий уровень фокусов pATM обусловлен фактическим отсутствием фосфорилирования белка-трансдуктора ATM. Соответственно, при расчете поглощенной дозы ядрами клеток при воздействии НТО, некорректно использовать применяемую экспоненциальную модель репарации ДР ДНК. Необходимы дополнительные исследования процессов

репарации ДР ДНК при облучении в сверхмальных дозах для получения более точных дозовых зависимостей.

Молекулярные механизмы репарации ДР ДНК позволяют предположить, что количество фокусов фосфорилированного сенсора повреждения ДНК  $\gamma$ H2AX должно быть больше, чем фокусов других маркеров ДР ДНК. Доминирование  $\gamma$ H2AX можно объяснить его фосфорилированием несколькими киназами (а не только киназой ATM) и тем, что специфический белок 53BP1 является медиатором и эффектором репарации ДР ДНК только путем НГСК. Существует гипотеза, что структура хроматина вокруг повреждения ДНК изменяется, чтобы увеличить доступность ДНК для механизмов репарации, а  $\gamma$ H2AX участвуют в ремоделировании до полного восстановления хроматина. Возможно также, что рыхлая структура эухроматина релаксируется ATM-независимым образом и отличается от релаксации гетерохроматина [149].

Другие проведенные нами экспериментальные исследования показывают различное количество фокусов  $\gamma$ H2AX в ядрах MRC-5 при инкубации с  $^3$ H-тимидином, и  $^3$ H-аминокислотами ( $^3$ H-глицином,  $^3$ H-аланином,  $^3$ H-пролином). Эффект от  $^3$ H-тимицина был более чем в 2 раза выше, чем при инкубации с  $^3$ H-аминокислотами. За счет высокой концентрации  $^3$ H-тимицина в ядре клетки и непосредственного его включения в структуру ДНК оказывает более серьезное ионизирующее воздействие в ядре по сравнению с  $^3$ H-меченными аминокислотами, которые равномерно распределяются не только в ядре, но во всем объеме клетки. То, что клеточные эффекты  $^3$ H-тимицина существенно выше эффектов от  $^3$ H-аминокислот подтверждается более ранними исследованиями выживаемости, пролиферации и мутагенных эффектов в клетках [47, 49]. Иерархическая последовательность клеточных эффектов различных  $^3$ H-аминокислот согласуется с иерархией их содержания в белках хроматина (гистонах и негистоновых белках), что подтверждает предположение о доминирующем воздействии соединений с тритием непосредственно входящим в состав ядерных структур клетки.

Эксперименты *in vitro* с МСК и MRC-5 показали сравнимые значения фокусов белков репарации  $\gamma$ H2AX при инкубации с  $^3$ Н-тимидином с радиоактивностью в диапазоне 100-400 МБк/л. На этом основании можно предположить, что клетки различных тканей органов человека с близкой морфологией и размерами клеточных структур, а также со схожей пролиферативной активностью, будут иметь близкие значения клеточных эффектов, обусловленные одинаковым количеством поглощенной дозы клеточными ядрами. То, что клеточные эффекты от  $^3$ Н-аминокислот выше, чем от НТО подтверждается литературными источниками [47, 49, 62, 72].

В экспериментах *in vivo* на крысах при анализе фокусов репарации ДР ДНК  $\gamma$ H2AX в клетках селезенки установлено увеличение их количества относительно контроля, как при воздействии НТО, так и при воздействии  $^3$ Н-тимицина. Более выраженное повреждающее действие на образование ДР ДНК оказывает  $^3$ Н-тимицин, чем НТО. Отмечается только небольшое число пораженных тритием клеток по сравнению с общим количеством спленоцитов при потреблении крысами питьевой воды с тритированными соединениями активностью 200 кБк/л.

В исследовании, где поступающая с питьем в организм крыс трития объемная активность была равной 800 кБк/л, при анализе микроядер в ПХЭ костного мозга генотоксический эффект был обнаружен как для НТО, так и для  $^3$ Н-тимицина. При меньшей объемной активности в 200 кБк/л статистически значимый эффект образования микроядер в исследовании не выявлен, тем не менее значения микроядер в ПХЭ костного мозга при приеме трития были немного выше, чем в контроле. Следует отметить, что в других экспериментах не было выявлено микроядер в ПХЭ костного мозга и фокусов систем репарации у мышей при длительном приеме при объемных активностях НТО и ОСТ до 1 МБк/л и выше [4, 72]. Отличие в результатах экспериментов связано с более высоким генотоксическим эффектом при приеме с водой  $^3$ Н-тимицина по сравнению с приемом раствора  $^3$ Н-аминокислот ( $^3$ Н-аланин,  $^3$ Н-глицин,  $^3$ Н-пролин), что косвенно подтверждается экспериментами *in vitro* на клетках MRC-5 с указанными тритированными соединениями.

То, что активно включающийся в структуру ДНК  $^3\text{H}$ -тимидин значительно более токсичен, чем равномерно распределенный НТО, подтверждается всеми сравнительными экспериментами с этими соединениями. Проведенный анализ с  $^3\text{H}$ -тимидином и НТО фокусов белков репарации  $\gamma\text{H2AX}$  в экспериментах *in vitro* показывает более высокую разницу в их количестве, чем в экспериментах *in vivo*. Данный факт обусловлен отличием биокинетики и метаболизма в организме млекопитающих НТО и нуклеозидов. Так, почти 100% НТО полностью абсорбируется желудочно-кишечном тракте и распределяется пропорционально водному составу тканей органов, но только всего 10-20%  $^3\text{H}$ -тимицина при пероральном приеме попадает в кровоток. Тем не менее,  $^3\text{H}$ -тимидин имеет тенденцию накопления в ДНК клеток из-за длительного сохранения предшественников ДНК в клетках по сравнению с достаточно быстрым метаболизмом НТО и аминокислот, что приводит к более высоким поглощенным дозам в ядрах клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практический интерес к исследованиям биологической опасности трития проявляется из-за его наличия в окружающей среде и потенциальным повышением его концентрации в связи с будущим развитием ядерных технологий. Большинство существующих работ посвящено изучению функциональной реакции высоких доз НТО, но исследования степени воздействия различных органических молекулярных соединений трития имеет ограниченный характер. Представляет большой интерес оценка биологических эффектов при хроническом воздействии тритированных соединений со средней и низкой мощностью дозы.

В настоящее время в биодозиметрии с целью определения степени воздействия радиационного облучения активно используется иммуноцитохимический анализ фокусов белков маркеров ДР ДНК. Большинство работ относится к исследованиям воздействия внешнего по отношению к объекту фотонного излучения (рентгеновское и гамма-излучение). Существует относительно мало исследований, посвященных изучению образования фокусов белков маркеров ДР ДНК от внутреннего облучения при распаде радионуклидов. Основной особенностью излучения радионуклида трития является появление при его распаде электронов низкого энергетического диапазона в единицы кэВ и небольшая глубина проникновения излучения в ткани, сопоставимая с размерами ядер клеток эукариот. Соответственно, от трития, расположенного в ядре клетки, энергия излучения почти полностью сосредоточена в ядре клетки и небольшой области цитоплазмы. Поэтому при расчете доз трития необходимо учитывать низкоэнергетический спектр бета-излучения и использовать дозиметрию, адаптированную к расчетам в масштабе клеточных и субклеточных структур.

В ходе проведенных нами исследований были получены новые данные об особенностях формирования отклика культивируемых МСК и MRC-5 человека, а также спленоцитов и ПХЭ костного мозга органов крыс, на воздействие бета-излучения трития. Подтверждается низкий эффект от воздействия трития в

неорганической форме (НТО) и значительно более высокое воздействие от ОСТ, что объясняется активным включением различных видов ОСТ в ядра и цитоплазму клеток.

Проведенные измерения радиоактивности трития в ядрах и клетках МСК костного мозга человека показали равномерное распределение НТО и большое локальное накопление ОСТ ( $^3\text{H}$ -тимицина) в ДНК клеток. Во всех экспериментах на клетках *in vitro* наблюдается непрерывное и линейное увеличение количества фокусов. В ядрах МСК при инкубации с  $^3\text{H}$ -тимицином в течение 24 ч отмечается количественная иерархия фокусов  $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM}$ , а соотношение количества этих фокусов подобно отношению количества фокусов в экспериментах с рентгеновским излучением в том же диапазоне доз. Молекулярные механизмы репарации ДР ДНК приводят к большему количеству фокусов фосфорилированного сенсора повреждения ДНК  $\gamma\text{H2AX}$ , чем маркеров 53BP1 и pATM. Доминирование  $\gamma\text{H2AX}$  можно объяснить его фосфорилированием несколькими киназами (а не только киназой ATM) и тем, что специфический белок 53BP1 является медиатором и эффектором репарации ДР ДНК только путем НГСК. Можно утверждать, что путь репарации НГСК является доминирующим и имеет схожий белковый механизм при внутреннем хроническом облучении тритием и при внешнем остром рентгеновском облучении.

Определение радиоактивности непосредственно в суспензиях клеток, ядер и ДНК позволили провести сравнение поглощенных доз в ядрах МСК при инкубации с  $^3\text{H}$ -тимицином и НТО с одинаковой активностью культуральной среды. Показано, что большая разница в клеточных эффектах от  $^3\text{H}$ -тимицина и НТО фактически определяется степенью концентрации соответствующего соединения с тритием в ядрах клеток. Из-за равномерного распределения НТО и аккумуляции  $^3\text{H}$ -тимицина в ДНК, значения их поглощенных доз в ядрах клеток отличаются почти на два порядка. В области сверхмалых доз (до 10 мГр) от внутреннего облучения радионуклидом трития (НТО) наблюдаются отличные от воздействия  $^3\text{H}$ -тимицина процессы репарации. Соответственно, для более

точного определения дозовой нагрузки от НТО необходимы данные по кинетике репарации ДР ДНК в области сверхмалых доз.

Почти двух кратная разница количества фокусов  $\gamma$ H2AX в экспериментах *in vitro* с фибробластами легкого человека MRC-5 при инкубации с  $^3$ H-тимидином показывает больший эффект из-за концентрации нуклеозидов в ядре клетки, тогда как  $^3$ H-аминокислоты распределены по всему объему клетки. Проведенный анализ с использованием открытых баз данных белков выявил зависимость клеточных эффектов от количественного состава  $^3$ H-аминокислот в гистонах и негистоновых белках хроматина.

В нашей работе также проведено сравнение количества белков-репарации ДР ДНК от  $^3$ H-тимицина и НТО, потребляемых перорально со слабой активностью в экспериментах *in vivo* с крысами. Слабая активность приводит к редкой маркировке клеток тритием в тканях органов млекопитающих с единичным числом его распадов в ядрах клеток, поэтому средняя доза для тканей органов является ненадежным индикатором токсичности трития на клеточном уровне.

При определении зависимостей стохастических эффектов от дозы излучения радионуклидов следует принимать во внимание состав их энергетических спектров, размеры клеточных структур и механизмы восстановления клеточных повреждений. Методы дозиметрии радионуклидов требуют дальнейшего усовершенствования, особенно в отношении частиц сверхнизкой энергии с малым радиусом действия, которые приводят к разрывам ДНК. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов биологического ответа клеток человека на воздействие внутреннего низкоэнергетического излучения радионуклидов в средних и малых дозах. Углубленные и всесторонние исследования необходимы для дальнейшего изучения механизмов, лежащих в основе цитогенетических эффектов.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена линейная зависимость между количеством фокусов белков репарации ДНК и радиоактивностью трития в культуральной среде (100-400 МБк/л) в несинхронизированных МСК ( $\gamma$ H2AX>53BP1>pATM) и популяциях фибробластов легкого человека MRC-5 ( $\gamma$ H2AX).
2. Расчет поглощенной дозы ядрами МСК показал превышение дозы от  $^3$ Н-тимицина в 80-150 раз по отношению к НТО, что объясняет большую разницу в количестве фокусов у этих соединений в 5,6 ( $\gamma$ H2AX), 6,2 (53BP1) и 26,4 (pATM).
3. Установлена зависимость «доза-эффект» в МСК для фокусов белков репарации ДНК без учета репарации («полная» доза за 24 ч: 6-24 мГр НТО, 0,38-1,90 Гр  $^3$ Н-тимицин), а также с учетом времени репарации («остаточная» доза: 0,4-2,0 мГр НТО, 0,06-0,31 Гр  $^3$ Н-тимицин).
4. Выявлено низкое количество pATM по отношению к  $\gamma$ H2AX (20%) и 53BP1 (30%) при инкубации с НТО, что объясняется слабым фосфорилированием белка-трансдуктора ATM при поглощенных дозах ядрами МСК в пределах 10 мГр.
5. В фибробластах легкого человека MRC-5 при инкубации в течение 24 ч  $^3$ Н-тимицин вызывает в 2 раза большее количество фокусов  $\gamma$ H2AX, чем  $^3$ Н-аминокислоты, а у  $^3$ Н-аланина на 30% больше по сравнению с  $^3$ Н-пролином.
6. Эксперименты с крысами, потребляющими питьевую воду с  $^3$ Н-тимицином и НТО с объемной активностью 200 кБк/л в течение 28 дней, свидетельствуют о слабых эффектах образования фокусов  $\gamma$ H2AX ( $^3$ Н-тимицин –  $0,27 \pm 0,01$ , НТО –  $0,16 \pm 0,01$  контроль –  $0,09 \pm 0,01$  фокусов на клетку) в спленоцитах селезенки крыс и микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга (частота  $5,2 \pm 1,4$ ,  $5,8 \pm 1,1$ ,  $4,5 \pm 1,2$  на 1000 клеток соответственно).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГР – гомологичная рекомбинация

Гр – Грей

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДР ДНК двунитевой разрыв ДНК

ИИ – ионизирующее излучение

НГСК – негомологичное соединение концов

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

ОБЭ – общая биологическая эффективность

ОСТ – органически связанный тритий

ПХЭ – полихроматофильные эритроциты

РНК – рибонуклеиновая кислота

53BP1 (англ. p53 binding protein) – p53-связывающий белок

АТМ (англ. Ataxia telangiectasia mutated) – серин/треониновая протеинкиназа, мутация по которой вызывает заболевание – атаксия телеангиэктазия

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) – 4',6-диамицино-2-фенилиндол дигидрохлорид

DLM (англ. Dominant lethal mutations) – доминантные летальные мутации

MRC-5 (англ. Medical research council -5) – линия клеток фибробластов легкого человека

$\gamma$ H2AX (англ. gamma-H2AX) – фосфорилированная форма корового гистона H2AX

pATM (англ. Phospho-ATM) – киназа ATM, фосфорилированная по серину 1981

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CNSC 2010. Health Effects, Dosimetry and Radiological Protection of Tritium. INFO-0799. – Canada : Canadian Nuclear Safety Commission, 2010. – 208 p.
2. Annex C. Biological effects of selected internal emitters – tritium // UNSCEAR 2016. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. – New York : United Nations, 2017. – P. 241-360.
3. NCRP 1979. Report № 63. Tritium and other radionuclide labeled organic compounds incorporated in genetic material. – Washington, DC : National Council on Radiation Protection and Measurements, 1979. – 147 p.
4. NCRP 2018. Report 181. National Council on Radiation Protection and Measurements. Evaluation of the relative effectiveness of low-energy photons and electrons in inducing cancer in humans. – Bethesda : National Council on Radiation Protection and Measurements, 2018.
5. RCE-4. Review of risks from tritium. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation. – Chilton : Health Protection Agency, 2007. – 100 p.
6. Torgovnick, A. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy / A. Torgovnick, B. Schumacher // Front Genet. – 2015. – V. 6. – P. 157. – DOI: 10.3389/fgene.2015.00157.
7. Биологические эффекты органических и неорганических соединений трития / Д. В. Гурьев, О. А. Кочетков, В. Г. Барчуков, А. Н. Осипов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 5-10. – DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-2-5-10.
8. Evaluation of DNA double-strand break repair capacity in human cells: Critical overview of current functional methods / X. Tatin, G. Muggiolu, S. Sauvaigo, J. Breton // Mutat Res Rev Mutat Res. – 2021. – V. 788. – Article: 108388. – DOI: 10.1016/j.mrrev.2021.108388.
9. Rapport IRSN 2021-00206. Actualisation des connaissances sur les effets biologiques du tritium. – Nanterre : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, 2021. – 66 p.

10. Little, M. P. Systematic review of experimental studies of relative biological effectiveness of tritium / M. P. Little, B. E. Lamber // Radiat Environ Biophys. – 2008. – V. 47. – № 1. – P. 71-93. – DOI: 10.1007/s00411-007-0143-y.
11. Straume, T. Tritium radiobiology and relative biological effectiveness / T. Straume, A. L. Carsten // Health Physics. – 1993. – V. 65. – № 6. – P. 657-672. – DOI: 10.1097/00004032-199312000-00005.
12. Роднева, С. М. Теоретический анализ качества излучения и относительной биологической эффективности трития / С. М. Роднева, Д. В. Гурьев // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2024. – Т. 69. – № 2. – С. 65-72. – DOI: 10.33266/1024-6177-2024-69-2-65-72.
13. Ленский, Л. А. Физика и химия трития / Л. А. Ленский. – Москва : Энергоиздат, 1981. – 113 с.
14. Diabate, S. Organically bound tritium / S. Diabate, S. Strack // Health Phys. – 1993. – V. 65 – № 6. – P. 698-712. – DOI: 10.1097/00004032-199312000-00008.
15. Myers, D. K. ACRP-10 Toxicity and dosimetry of tritium: a review. INFO-0377E / D. K. Myers, J. R. Johnson. – Ottawa, Canada : Atomic Energy Control Board, Advisory Committee on Radiological Protection, 1991. – 64 p.
16. Грачева, Л. М. Генетические эффекты распада радионуклидов в клетках / Л. М. Грачева, В. Г. Королев. – Москва : Атомиздат, 1977. – 144 с.
17. Carsten, A. L. Tritium in the environment: isotopic effects and transmutation / A. L. Carsten // Advances in Radiation Biology / J. T. Lett, H. Adler. – New York : Academic Press, 1979. – P. 419-458.
18. Feinendegen, L. E. Transmutation versus beta irradiation in the pathological effects of tritium decay / L. E. Feinendegen, V. P. Bond // Tritium / A. A. Moghissi, M. W. Carter. – Messenger Graphics, Phoenix, 1971. – P. 221-231.
19. Computational strategy for studying structural change of tritium-substituted macromolecules by a beta decay to helium-3 / S. Fujiwara, H. Nakamura, H. Li [et al.] // J Adv Sim Sci Eng. – 2019. – V. 6. – № 1. – С. 94-99. – DOI: 10.15748/jasse.6.94.
20. Quantitative Correlations between Radiosensitivity Biomarkers Show That the ATM Protein Kinase Is Strongly Involved in the Radiotoxicities Observed after

Radiotherapy / L. R. Eymeric, L. Bodgi, A. Granzotto [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23. – № 18. – Article: 10434. – DOI: 10.3390/ijms231810434.

21. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts / A. Osipov, A. Chigasova, E. Yashkina [et al.] // Cells. – 2023. – V. 12. – № 8. – Article: 1209. – DOI: 10.3390/cells12081209.

22. Chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to tritiated water in vitro / E. Bocian, B. Ziemb-Zak, O. Rosiek, J. Sablinski // Curr Top Radiat Res Q. – 1978. – V. 12. – № 1-4. – P. 168-181

23. Hori, T. A. Unusual dose-response of chromosome aberrations induced in human lymphocytes by very low dose exposure to tritium / T. A. Hori, S. Nakai // Mutation Res. – 1978. – V. 50. – P. 101-110. – DOI: 10.1016/0027-5107(78)90065-9.

24. The introduction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro / J. S. Prosser, D. C. Lloyd, A. A. Edwards, J. W. Stather // Radiat Prot Dosim. – 1983. – V. 4. – № 1. – P. 21-26.

25. Liber, H. L. Toxicity and mutagenicity of X-rays and [<sup>125</sup>I]dUrd or (<sup>3</sup>H]TdR incorporated in the DNA of human lymphoblast cells / H. L. Liber, P. K. LeMotte, J. B. Little // Mutat Res. – 1983. – V. 111. – № 3. – P. 387-404. – DOI: 10.1016/0027-5107(83)90035-0.

26. Vulpis, N. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with beta particles from tritiated water / N. Vulpis // Radiat Res. – 1984. – V. 97. – № 3. – P. 511-518.

27. Liber, H. L. Toxicity and mutagenicity of low dose rates of ionizing radiation from tritiated water in human lymphoblastoid cells / H. L. Liber, V. H. Ozaki, J. Little // Mutat. Res. – 1985. – V. 157. – P. 77-86. – DOI: 10.1016/0165-1218(85)90052-7.

28. Tanaka, K. Relative biological effectiveness and dose rate effect of tritiated water on chromosomes in human lymphocytes and bone marrow cells / K. Tanaka, S. Sawada, N. Kamada // Mutat Res. – 1994. – V. 323. – № 1-2. – P. 53-61. – DOI: 10.1016/0165-7992(94)90045-0.

29. Balakrishnan, S. Cytogenetic Effects of Tritiated Water (HTO) in Human Peripheral Blood Lymphocytes in vitro / S. Balakrishnan, B. S. Rao // Int J Hum Genet. – 2004. – V. 4. – № 4. – P. 237-242. – DOI: 10.1080/09723757.2004.11885900.
30. Snigireva, G. P. Estimation of relative biological effectiveness of tritium according to chromosome aberration frequency in human blood lymphocytes / G. P. Snigireva, T. I. Khaimovich, V. I. Nagiba // Biophysics. – 2011. – V. 56. – № 2. – P. 364-370. – DOI:10.1134/S0006350911020291.
31. Cytogenetic Effects of Low-Dose Tritiated Water in Human Peripheral Blood Lymphocytes-Experimental Studies on the Relative Biological Effectiveness and Chromosome Aberration Rate and CBMN in Human Blood Lymphocyte Irradiated by Tritium Low Dose Tritium  $\beta$ -Rays and  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -Rays / B. Deng, J. Hou, Y. Quan [et al.] // Open J Clin Diagn. – 2015. – V. 5. – № 4. – P. 125-135. – DOI: 10.4236/ojcd.2015.54021.
32. Cell death and cell-cycle arrest induced by incorporation of [ $^3\text{H}$ ] thymidine into human haemopoietic cell lines / M. Yanokura, K. Takase, K. Yamamoto, H. Teraoka // Int J Radiat Biol. – 2000. – V. 76. – № 3. – P. 295-303. – DOI: 10.1080/095530000138637.
33. Quan, Y. The response of human mesenchymal stem cells to internal exposure to tritium  $\beta$ -rays / Y. Quan, J. Lin, B. Deng // J Radiat Res. – 2019. – V. 60. – № 4. – P. 476-482. – DOI: 10.1093/jrr/rrz037.
34. Comparative Analysis of the Formation of  $\gamma$ H2AX Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to  $^3\text{H}$ -Thymidine, Tritium Oxide, and X-Rays Irradiation / N. Y. Vorob'eva, O. A. Kochetkov, M. V. Pustovalova [et al.] // Bull Exp Biol Med. – 2018. – T. 166. – C. 178-181. – DOI: 10.1007/s10517-018-4309-1.
35. Влияние  $^3\text{H}$ -тимицина на индукцию двунитевых разрывов ДНК в мезенхимальных стволовых клетках человека / Н. Ю. Воробьева, В. В. Уйба, О. А. Кочетков [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2018. – Т. 63. – № 1. – С. 28-34. – DOI: 10.12737/article5a855c9d5b1211.49546901.
36. Сравнительное исследование изменений количества фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в мезенхимальных стromальных клетках человека, инкубированных с  $^3\text{H}$ -

- тимидином или тритированной водой / Н. Ю. Воробьева, А. А. Осипов, А. К. Чигасова [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2023. – Т. 68. – № 3. – DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-3-5-10.
37. The low dose effects of human mammary epithelial cells induced by internal exposure to low radioactive tritiated water / Y. Quan, C. Zhou, B. Deng, J. Lin // *Toxicol In Vitro*. – 2019. – V. 61. – Article: 104608. – DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104608.
38. Comparative Study of the  $\gamma$ H2AX Foci Forming in Human Lung Fibroblasts Incubated in Media Containing Tritium-Labeled Thymidine or Amino Acids / S. M. Rodneva, A. A. Osipov, D. V. Guryev [et al.] // *Bull Exp Biol Med*. – 2021. – V. 172. – P. 245-249. – DOI: 10.1007/s10517-021-05370-6.
39. Dewey, W. C. Comparisons of Tritiated Thymidine, Tritiated Water, and Cobalt-60 Gamma Rays in Inducing Chromosomal Aberrations / W. C. Dewey, R. M. Humphrey, B. A. Jones // *Radiat Res*. – 1965. – V. 24. – № 2. – P. 214-238.
40. Brewen, J. G. The kinetics of chromatid aberrations induced in Chinese hamster cells by tritium-labeled thymidine / J. G. Brewen, G. Olivieli // *Radiat Res*. – 1966. – V. 28. – № 4. – P. 779-792.
41. Burki, H. J. Killing of cultured mammalian cells by radioactive decay of tritiated thymidine at-196 C / H. J. Burki, S. Okada // *Radiat Res*. – 1970. – V. 41. – № 2. – P. 409-424. – DOI: 10.2307/3572886.
42. Cell killing by gamma rays and beta particles from tritiated water and incorporated tritiated thymidine / J. S. Bedford, J. B. Mitchell, H. G. Griggs, M. A. Bender // *Radiat Res*. – 1975. – V. 63. – № 3. – P. 531-543. – DOI: 10.2307/3574104.
43. Saintigny, Y. Homologous recombination is involved in the repair response of mammalian cells to low doses of tritium / Y. Saintigny, S. Roche, D. Meynard, B. S. Lopez // *Radiat Res*. – 2008. – V. 170. – № 2. – P. 172-183. – DOI: 10.1667/RR1089.1.
44. Cleaver, J. E. Induction of thioguanine- and ouabain-resistant mutants and single-strand breaks in the DNA of Chinese hamster ovary cells by  $^3\text{H}$ -thymidine / J. E. Cleaver // *Genetics*. – 1977. – V. 87. – № 1. – P. 129-138. – DOI: 10.1093/genetics/87.1.129.

45. Ueno, A. M. Induction of cell killing, micronuclei, and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to low-dose-rate  $\gamma$  rays and tritiated water in cultured mammalian cells (L5178Y) / A. M. Ueno, I. Furuno-Fukushi, H. Matsudaira // Radiation research. – 1982. – V. 91. – № 3. – P. 447-456. – DOI: 10.2307/3575884.
46. Little, J. B. Induction of neoplastic transformation by low-dose-rate exposure to tritiated water / J. B. Little // Radiat Res. – 1986. – V. 107. – № 2. – P. 225-233. – DOI: 10.2307/3576810.
47. Furuno-Fukushi, I. Cell killing and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to tritiated amino acids and tritiated thymidine in cultured mammalian cells (L5178Y) / I. Furuno-Fukushi, A. M. Ueno, H. Matsudaira // Radiat Res. – 1987. – V. 110. – № 3. – P. 428-438. – DOI: 10.2307/3577009.
48. Induction of malignant transformation in mouse 10T $\frac{1}{2}$  cells by low-dose-rate exposure to tritiated water and gamma-rays at two different temperatures, 4°C and 37°C / T. Yamaguchi, M. Yasukawa, T. Terasima, H. Matsudaira // J Radiat Res. – 1989. – V. 30. – № 1. – P. 112-121. – DOI: 10.1269/jrr.30.112.
49. Effects of beta radiation from organically bound tritium on cultured mouse embryonic mid brain cells / B. Wang, K. Watanabe, T. Yamada, A. Shima // Health Phys. – 1996. – V. 71. – № 6. – P. 915-921.
50. Tritium contamination of hematopoietic stem cells alters long-term hematopoietic reconstitution / F. Di Giacomo, C. Granotier, V. Barroca [et al.] // Int J Radiat Biol. – 2011. – V. 87. – № 6. – P. 556-570. – DOI: 10.3109/09553002.2011.565399.
51. Streffler, C. Comparative effects of tritiated water and thymidine on the preimplanted mouse embryo in vitro / C. Streffer, D. Van Beuningen, S. Elias // Curr Top Radiat Res Q. – 1978. – V. 12. – № 1-4. – P. 182-193.
52. Effect of Chronic HTO  $\beta$  or  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  Radiation on Preimplantation Mouse Development in Vitro / T. Yamada, O. Yukawa, K. Asami, T. Nakazawa // Radiat Res. – 1982. – V. 92. – № 2. – P. 359-369. – DOI: 10.2307/3576012.
53. The toxicity of tritium: the effects of tritiated amino-acids on preimplanted mouse embryos / L. Clerici, M. J. Carroll, M. Merlini [et al.] // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. – 1984. – V. 45. – № 3. – P. 245-250.

54. Radiotoxicities of [<sup>3</sup>H] thymidine and of [<sup>3</sup>H] arginine compared in mouse embryos in vitro / W. U. Müller, C. Streffer, M. Molls, L. Glück // Radiat Res. – 1987. – V. 110. – № 2. – P. 192-198. – DOI: 10.2307/3576898.
55. Huang, C. C. Extensive chromosome aberrations caused by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation in a diploid monkey cell line DBS-FRhL-2 / C. C. Huang, T. A. Ninan, J. C. Petricciani // In Vitro. – 1975. – V. 11. – № 4. – P. 234-238. – DOI: 10.1007/BF02616339.
56. Bond, V. P. Intranuclear <sup>3</sup>H thymidine: dosimetric, radiobiological and radiation protection aspects / V. P. Bond, L. E. Feinendegen // Health Phys. – 1966. – V. 12. – № 8. – P. 1007-1020
57. HTO oral administration in mice. I: Threshold dose rate for haematopoietic death / O. Yamamoto, K. Yokoro, T. Seyama [et al.] // Int J Radiat Biol. – 1990. – V. 57. – № 3. – P. 543-549. – DOI: 10.1080/09553009014552681.
58. Oral administration of tritiated water (HTO) in mouse. II. Tumour development / O. Yamamoto, T. Seyama, T. Jo [et al]. // Int J Radiat Biol. – 1995. – V. 68. – № 1. – P. 47-54. – DOI: 10.1080/09553009514550911.
59. Occurrence of mammary tumors in rats after exposure to tritium beta rays and 200-kVp X rays / N. J. Gragtmans, D. K. Myers, J. R. Johnson [et al.] // Radiat Res. – 1984. – V. 99. – № 3. – P. 636-650. – DOI: 10.2307/3576337.
60. Carsten, A. L. Dominant lethal mutations in mice resulting from chronic tritiated water (HTO) ingestion / A. L. Carsten, S. L. Commerford // Radiat Res. – 1976. – V. 66. – № 3. – P. 609-614. – DOI: 10.2307/3574464.
61. Mewissen, D. J. Genetic effects from exposure of male mice to tritium for six generations / D. J. Mewissen, A. S. Ugarte, J. H. Rust // Radiat Res. – 1970. – V. 70. – № 2. – P. 629-640
62. Balonov, M. I. Tritium radiobiological effects in mammals: review of experiments of the last decade in Russia / M. I. Balonov, K. N. Muksinova, G. S. Mushkacheva // Health phys. – 1993. – V. 65. – № 6. – P. 713-726.

63. Experimental study on relative biological effectiveness of tritium and risk estimates of genetic damage / X. Zhou, J. Dong, S. Zhou [et al.] // Chin Med J. – 1989. – V. 102. – № 11. – P. 872-878.
64. In utero haemopoietic sensitivity to alpha, beta or X-irradiation in CBA/H mice / R. Kozlowski, S. D. Bouffler, J. W. Haines [et al.] // Int J Radiat Biol. – 2001. – V. 77. – №. 7. – P. 805-815.
65. Chopra, C. Cytogenetic measurements of the relative biological effectiveness of tritium. INFO-0287 / C. Chopra, J. A. Heddle. – Ottawa, Canada : Atomic Energy Control Board, 1988. – 242 p.
66. Tritium biology in Japan: A search for a new approach / H. Tauchi, M. Toyoshima-Sasatani, H. Nagashima [et al.] // Fusion Eng Des. – 2018. – V. 128. – P. 28-32. – DOI: 10.1016/j.fusengdes.2018.01.029.
67. Tissue distribution, excretion and effects on genotoxicity of tritium following oral administration to rats / J. H. Lee, C. S. Kim, S. I. Choi [et al.] // Nucl Eng Technol. – 2019. – V. 51. – № 1. – P. 303-309. – DOI: 10.1016/j.net.2018.09.013.
68. Генотоксический эффект оксида трития и  $^3\text{H}$ -тимицина в селезенке и костном мозге крыс Wistar при длительном поступлении с питьевой водой / С. М. Роднева, Л. П. Сычева, А. А. Максимов [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2024. – Т. 69. – № 5. – С. 15-20. – DOI: 10.33266/1024-6177-2024-69-5-15-20.
69. The lack of cytotoxic effect and radioadaptive response in splenocytes of mice exposed to low level internal  $\beta$ -particle irradiation through tritiated drinking water *in vivo* / M. Flegal, M. Blimkie, S. Roch-Lefevre [et al.] // Int J Mol Sci. – 2013. – V. 14. – № 12. – P. 23791-23800. – DOI: 10.3390/ijms141223791.
70. Environmentally relevant chronic low-dose tritium and gamma exposures do not increase somatic intrachromosomal recombination in pKZ1 mouse spleen / L. Bannister, M. Serran, L. Bertrand [et al.] // Radiat Res. – 2016. – V. 186. – № 6. – P. 539-548. – DOI: 10.1667/RR14564.1.

71. Tritium (3H) retention in mice: Administered as HTO, DTO or as 3 H-Labeled amino-acids / N. D. Priest, M. S. J. Blimkie, H. Wyatt [et al.] // *Health Phys.* – 2017. – V. 112. – № 5. – P. 439-444. – DOI: 10.1097/HP.0000000000000637.
72. Cytogenetic damage analysis in mice chronically exposed to low-dose internal tritium beta-particle radiation / S. Roch-Lefèvre, E. Grégoire, C. Martin-Bodiot [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – V. 9. – № 44. – Article: 27397. – DOI: 10.18632/oncotarget.25282.
73. In vivo animal studies help achieve international consensus on standards and guidelines for health risk estimates for chronic exposure to low levels of tritium in drinking water / Y. Guéguen, N. D. Priest, I. Dublineau [et al.] // *Environ Mol Mutagen.* – 2018. – V. 59. – № 7. – P. 586-594. – DOI: 10.1002/em.22200.
74. HTO, tritiated amino acid exposure and external exposure induce differential effects on hematopoiesis and iron metabolism / J. M. Bertho, D. Kereselidze, L. Manens [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – V. 9. – № 1. – Article: 19919. – DOI: 10.1038/s41598-019-56453-4.
75. Commerford, S. L. Tritium metabolism in mammals / S.L. Commerford // European seminar on the risks from tritium exposure / G. Gerber, C. Myttenaere // Proceedings of a meeting jointly organised by the Commission of the European Communities and the Belgian Nuclear Centre, Mol, Belgium, 22-24 November 1982. Radiation Protection Series VI. – Luxembourg : CEC, 1984. – P. 235-250.
76. Lambert, B. E. Radiation doses resulting from the ingestion of tritiated thymidine by the rat / B. E. Lambert, R. J. Clifton // *Health Physics.* – 1968. – V. 15. – № 1. – P. 3-9.
77. Takeda, H. Radiation doses to the tissues of rat from tritiated thymidine administered by three different routes / H. Takeda, T. Iwakura, Y. Mabuchi // *J Radiat Res.* – 1984. – V. 25. – № 3. – P. 194-202. – DOI: /10.1269/jrr.25.194.
78. Takeda, H. Biological behavior of tritium after administration of tritiated water in the rat / H. Takeda, Y. Kasida // *J Radiat Res.* – 1979. – V. 20. – № 2. – P. 174-185. – DOI: 10.1269/jrr.20.174.

79. Doses from the consumption of Cardiff Bay flounder containing organically bound tritium / A. Hodgson, J. E. Scott, T. P. Fell, J. D. Harrison // J Radiol Prot. – 2005. – V. 25. – № 2. – P. 149. – DOI: 10.1088/0952-4746/25/2/003.
80. Rodgers, D. W. Tritium dynamics in mice exposed to tritiated water and diet / D. W. Rodgers // Health physics. – 1992. – V. 63. – № 3. – P. 331-337.
81. Harrison, J. D. Uncertainties in dose coefficients for intakes of tritiated water and organically bound forms of tritium by members of the public / J. D. Harrison, A. Khursheed, B. E. Lambert // Radiat Prot Dosim. – 2002. – V. 98. – № 3. – P. 299-311. – DOI:10.1093/oxfordjournals.rpd.a006722.
82. Hill, R. L Metabolism and dosimetry of tritium / R. L. Hill, J. R. Johnson // Health Phys. – 1993. – V. 65. – № 6. – P. 628-647. – DOI: 10.1097/00004032-199312000-00003.
83. Takeda, H. Comparison of tritium metabolism in rat following single or continuous ingestion of tritium labeled wheat versus tritiated water / H. Takeda, K. Arai, T. Iwakura // J Radiat Res. – 1985. – V. 26. – № 1. – P. 131-139. – DOI: 10.1269/jrr.26.131.
84. Takeda, H. Incorporation and distribution of tritium in rats after chronic exposure to various tritiated compounds / H. Takeda // Int J Radiat Biol. – 1991. – V. 59. – № 3. – P. 843-853. – DOI: 10.1080/09553009114550731.
85. Rochalska, M. The incorporation of organically-bound tritium of food into some organs of the rat / M. Rochalska, Z. Szot // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. – 1977. – V. 31. – № 4. – P. 391-395. – DOI: 10.1080/09553007714550461.
86. Pietrzak-Flis, Z. Tritium in rabbits after ingestion of freeze-dried tritiated food and tritiated water / Z. Pietrzak-Flis, I. Radwan, L. Indeka // Radiat Res. – 1978. – V. 76. – № 2. – P. 420-428. – DOI: 10.2307/3574790.
87. Komatsu, K. Radiation dose to mouse liver cells from ingestion of tritiated food or water / K. Komatsu, Y. Okumura, K. Sakamoto // Health physics. – 1990. – V. 58. – № 5. – P. 625-629.
88. Comparative biokinetics of tritium in rats during continuous ingestion of tritiated water and tritium-labeled food / H. Takeda, H. M. Lu, K. Miyamoto [et al.] // Int J

Radiat Biol. – 2001. – V. 77. – № 3. – P. 375-381. – DOI: 10.1080/09553000010017117.

89. Климанов, В. А. Дозиметрия ионизирующих излучений / В. А. Климанов, Е. А. Крамер-Агеев, В. В. Смирнов ; под ред. В. А. Климанова. – Москва : НИЯУ МИФИ, 2015. – 740 с.
90. Stabin, M. Nuclear medicine dosimetry / M. Stabin // Phys Med Biol. – 2006. – V. 51. – № 13. – P. 187-202. – DOI: 10.1088/0031-9155/51/13/R1.
91. Saito, M. Blood tritium level as an estimate of soft tissue dose / M. Saito // Radiat Prot Dosim. – 2003. – V. 105. – № 1-4. – P. 417-420. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006272.
92. Saito, M. Blood tritium level as a conservative estimate of soft tissue dose after tritium injection in mice / M. Saito // Health Phys. – 1998. – V. 74. – № 5. – P. 561-567. – DOI: 10.1097/00004032-199805000-00003.
93. The Dose Absorbed by Lymphocytes Irradiated in Vitro with Instated Water / G. Scarpa, N. Vulpis, M. E. De Santis, G. Vulpis. // Phys Med Biol. – 1981. – V. 26. – P. 1137-1144. – DOI: 10.1088/0031-9155/26/6/012.
94. Bond, V. P. Intranuclear  $^3\text{H}$ -thymidine: Dosimetric, radiobiological and radiation protection aspects / V. P. Bond, L. E. Feinendeqen // Health Phys. – 1996. – V. 12. – P. 1007-1020. – DOI: 10.1097/00004032-196608000-00002.
95. Modeling dose deposition and DNA damage due to low-energy  $\beta^-$ emitters / D. Alloni, C. Cutaia, L. Mariotti [et al.] // Radiat Res. – 2014. – V.182. – № 3. – P. 322-330. – DOI: 10.1667/RR13664.1.
96. Howell, R. Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy: nonuniform activity distributions in solid tumors / R. Howell, D. Rao, K. Sastry // Med Phys. – 1989. – V. 16. – P. 66-74. – DOI: 10.1118/1.596404.
97. MIRD Cellular S values: self-absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and monoenergetic electron and alpha particle emitters incorporated into different cell compartments / S. M. Goddu, R. W. Howell, L. G. Bouchet [et al.]. – Reston VA, USA : Society of Nuclear Medicine, 1997. – 183 p.

98. Monte Carlo study of energy deposition at the sub-cellular level for application to targeted radionuclide therapy with low-energy electron emitters / D. Emfietzoglou, C. Bousis, C. Hindorf [et al.] // Nucl Instrum Methods Phys Res. – 2007. – V. 256. – № 1. – P. 547-553. – DOI: 10.1016/j.nimb.2006.12.055.
99. Subcellular S-factors for low-energy electrons: a comparison of Monte Carlo simulations and continuous- slowing-down calculations / D. Emfietzoglou, K. Kostarelos, P. Hadjidoukas [et al.] // Int J Radiat Biol. – 2008. – V. 84. – P. 1034-1044. – DOI: 10.1080/09553000802460180.
100. Роднева, С. М. Дозиметрия трития на клеточном уровне / С. М. Роднева, Д. В. Гурьев // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2023. – Т. 68. – № 1. – С. 92-100. – DOI: 10.33266/1024-6177-2023-68-1-92-100.
101. Howell, R. Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy: nonuniform activity distributions in solid tumors / R. Howell, D. Rao, K. Sastry // Med Phys. – 1989. – V. 16. – № 1. – P. 66-74. – DOI: 10.1118/1.596404.
102. Goddu, S. Cellular dosimetry: absorbed fractions for monoenergetic electron and alpha particle sources and S-values for radionuclides uniformly distributed in different cell compartments / S. Goddu, R. Howell, D. J. Rao // Nucl Med. – 1994. – V. 35. – № 3. – P. 303-316. – DOI: 10.1118/1.596404.
103. Cole, A. Absorption of 20-eV to 50.000-eV electron beams in air and plastic / A. Cole // Radiat Res. – 1969. – № 1. – V. 38. – P. 7-33.
104. Electron dosimetry for radioimmunotherapy: Optimal electron energy / K. Sastry, C. Haydock, A. Basha, D. Rao // Radiat Prot Dosim. – 1985. – V. 13. – P. 249-252. – DOI: 10.1093/rpd/13.1-4.249.
105. Modelling of the relationship between cell dimensions and mean dose delivered to the cell nucleus: application to five radionuclides used in nuclear medicine / I. Gardin, M. Faraggi, E. Hue, B. Bok // Phys Med Biol. – 1995. – V. 40. – № 6. – P. 1001-1014. – DOI: 0.1088/0031-9155/40/6/003.
106. The COOLER code: a novel analytical approach to calculate subcellular energy deposition by internal electron emitters / M. Siragusa, G. Baioeco, P. Fredericia [et al.] // Radiat Res. – 2017. – V. 188. – № 2. – P. 204-220. – DOI: 10.1667/RR14683.1.

107. Calculation of cellular S-values using Geant4-DNA: the effect of cell geometry / M. Šefl, S. Incerti, G. Papamichacl, D. Emfietzoglou // Appl Radiat Isot. – 2015. – V. 104. – P. 113-123. – DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.06.027.
108. Salim, R. Monte Carlo single-cell dosimetry using Geant4-DNA: the effects of cell nucleus displacement and rotation on cellular S values / R. Salim, P. Taherparvar // Radiat Environ Biophys. – 2019. – V. 58. – № 3. – P. 353-371. – DOI: 10.1007/s00411-019-00788-z.
109. Ulanovsky, A. A practical method for assessment of dose conversion coefficients for aquatic biota / A. Ulanovsky, G. Pröhl // Radiat Environ Biophys. – 2006. – V. 45. – № 3. – P. 203-214. – DOI: 10.1007/s00411-006-0061-4.
110. Amato, E. Absorbed fractions for electrons in ellipsoidal volumes / E. Amato, D. Lizio, S. Baldari // Phys Med Biol. – 2011. – V.56. – № 2. – P. 357-365. – DOI: 10.1088/0031-9155/56/2/005.
111. Salim, R. Cellular S values in spindle-shaped cells: a dosimetry study on more realistic cell geometries using Geant4-DNA Monte Carlo simulation toolkit / R. Salim, P. Taherparvar // Ann Nucl Med. – 2020. – V.34. – № 10. – P. 742-756. – DOI: 10.1007/s12149-020-01498-z.
112. Estimation of absorbed dose in cell nuclei due to DNA-bound  $^3\text{H}$  / M. Saito, M. Ishida, C. Streffer, M. Molls // Health Phys. – 1985. – V. 48. – № 4. – P. 465-473. – DOI: 10.1097/00004032-198504000-00009.
113. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре  $\beta$ -и  $\gamma$ -излучением от инкорпорированных и внешних источников. С<sub>2</sub>-блок, индуцированный  $\beta$ -частицами  $^3\text{H}$ -тимидина и  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  / Н. Я. Гильяно, Л. В. Коневега, С. И. Степанов [и др.] // Радиационная биология. – 2007. – Т. 47. – № 1. – С. 108-116.
114. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304 II. Функциональные особенности клеток / Н. Я. Гильяно, Е. Г. Семенова, Р. Ф. Федорцева, Л. Д. Коневега // Цитология. – 2008. – Т. 50. – № 7. – С. 576-584.

115. Озеров, И. В. Кинетическая модель репарации двунитевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при действии редкоионизирующего излучения с различной мощностью дозы / И. В. Озеров, А. Н. Осипов // Компьютерные исследования и моделирование. – 2015. – Т. 7. – № 1. – С. 159-176.
116. Fully integrated Monte Carlo simulation for evaluating radiation induced DNA damage and subsequent repair using Geant4-DNA / D. Sakata, O. Belov, M. Bordage [et al.] // Sci Rep. – 2020. – V. 10. – P. 20788. – DOI: 10.1038/s41598-020-75982-x.
117. A quantitative model of the major pathways for radiation-induced DNA double-strand break repair / O. V. Belov, E. A. Krasavin, M. S. Lyashko [et al.] // Theor Biol. – 2015. – V. 366. – P. 115-130. – DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.09.024.
118. Löbrich, M. Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts / M. Löbrich, P. Cooper, B. Rydberg // Radiat Res. – 1998. – V. 150. – № 6. – P. 619-626.
119. ICRP Publication 134. Occupational intakes of radio nuclides: Part 2. ICRP // Ann. ICRP. – 2016. – V. 45. – № 3/4. – 352 p.
120. Балонов, М. И. Дозиметрия и нормирование трития / М. И. Балонов. – Москва : Энергоатомиздат, 1983. – 152 с.
121. Etnier, E.L. Metabolism of organically bound tritium in man / E. L. Etnier, C. C. Travis, D. M. Hetrick // Radiat Res. – 1984. – V. 100. – № 3. – P. 487-502.
122. Diabate, S. Organically bound tritium / S. Diabate, S. Strack // Health Phys. – 1993. – V. 65 – № 6. – P. 698-712. – DOI: 10.1097/00004032-199312000-00008.
123. Richardson, R. B. A biochemical-based model for the dosimetry of dietary organically bound tritium – Part I: Physiological criteria / R. B. Richardson, D. W. Dunford // Health Phys. – 2003. – V. 85 – № 5. – P. 523-538. – DOI: 10.1097/00004032-200311000-00001.
124. Melintescu, A. D. Reassessment of tritium dose coefficients for the general public / A. Melintescu, D. Galcriu, H. Takeda // Radiat Prot Dosim. – 2007. – V. 127. – № 1-4. – P. 153-157. – DOI: 10.1093/rpd/ncm267.
125. Guidelines for drinking-water quality – 4th ed. / World Health Organization. – Malta : WHO, 2011. – 564 p.

126. Radiation protection and safety of radiation sources: International basic safety standards. General safety requirements Part 3 / International Atomic Energy Agency // IAEA Safety Standards Series No. GSR Part 3. – Vienna : IAEA, 2014. – 471 p.
127. Балонов, М. И. Оценка дозы от поступления окиси трития в организм человека: роль включения трития в органическое вещество тканей / М. И. Балонов, Л. А. Чипига // Радиационная гигиена. – 2016. – V. 9. – № 4. – С. 16-25. – DOI: 10.21514/1998-426X-2016-9-4-16-25.
128. Feinendegen, L. E. Radiation problems in fusion energy production / L. E. Feinendegen, E. P. Cronkite, V. P. Bond // Radiat Environ Biophys. – 1980. – V. 18. – P. 157-183.
129. Cleaver, J. E. Thymidine metabolism and cell kinetics / J. E. Cleaver // Frontiers of biology / A. Neuberger, E. L. Tatum. – Vol. 6. – Amsterdam : North Holland Publishing Co., 1967. – 259 p.
130. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. – Текст электронный // European Union : [официальный сайт]. – URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj> (дата обращения: 20.04.2025).
131. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом : Методические рекомендации. – Москва : Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации, 2001. – 22 с.
132. Mesenchymal stem cell deformability and implications for microvascular sequestration / H. H. Lipowsky, D. T. Bowers, B. L. Banik, J. L. Brown // Ann Biomed Eng. – 2018. – V. 46. – P. 640-654. – DOI: 10.1007/s10439-018-1985-y.
133. Microfluidic label-free selection of mesenchymal stem cell subpopulation during culture expansion extends the chondrogenic potential in vitro / L. Yin, Y. Wu, Z. Yang [et al.] // Lab on a Chip. – 2018. – V. 18. – № 6. – P. 878-889. – DOI: 10.1039/c7lc01005b.
134. Characterization of Human, Ovine and Porcine Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Critical In Vitro Comparison with Regard to Humans / E. K.

Westerkowsky, A. M. Soares de Almeida, M. Selle [et al.] // Life. – 2023. – V. 13. – №. 3. – P. 718. – DOI: 10.3390/life13030718.

135. Comprehensive Characterisation of Large-Scale Expanded Human Bone Marrow and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells / C. Merman, J. Garcia, S. Roberts [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2019, – V. 10. – №. 1. – P. 99. – DOI: 10.1186/s 13287-019-1202-4.

136. MRC-5 Cell Line: Human Fetal Lung Fibroblasts in Viral Research // Cytion: Premier Cell Bank for Authentic Human and Animal Cells (сайт). – URL: <https://www.cytion.com/Knowledge-Hub/Cell-Line-Insights/MRC-5-Cell-Line-Human-Fetal-Lung-Fibroblasts-in-Viral-Research/> (дата обращения: 21.04.2025 г.)

137. Müller, W. U. Effects of cell cycle specific exposure to 3H-thymidine or 3H-arginine on development and cell proliferation of mouse embryos / W. U. Müller, N. Heckeley, C. Streffer // Radiat Environ Biophys. – 1996. – V. 35. – P. 267-271.

138. Stros, M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin / M. Stros // Biochim Biophys Acta. – 2010. – V. 1799. – № 1-2. – P. 101-113. – DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.09.008.

139. Осипов, А. А. Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в фибробластах человека: фокусы белков репарации ДНК, пролиферация, аутофагия и старение : специальность 1.5.1 «Радиобиология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Осипов Андрей Андреевич ; МГУ имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2024. – 146 с.

140. Грехова, А. К. Особенности образования и репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и средних дозах : специальность 03.01.01 «Радиобиология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Грехова Анна Константиновна ; ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМА России. – Москва, 2018. – 111 с.

141. Пустовалова, М. В. Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках

человека : специальность 03.01.01 «Радиобиология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Пустовалова Маргарита Витальевна ; ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. – Москва, 2018. – 122 с.

142. Formation of  $\gamma$ H2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation / S. Ulyanenko, M. Pustovalova, S. Koryakin [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20. – № 11. – Article: 2645. – DOI:10.3390/ijms20112645.
143. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells / T. Neumaier, J. Swenson, C. Pham [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2012. – V. 109. – № 2. – P. 443-448. – DOI/10.1073/pnas.1117849108.
144. Asaithamby, A. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose  $\gamma$ -irradiation / A. Asaithamby, D. J. Chen // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – № 12. – P. 3913-3921. – DOI:10.1093/nar/gkp237.
145. Rothkamm, K. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses / K. Rothkamm, M. Lobrich // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – V. 100. – № 9. – P. 5057-5062. – DOI/10.1073/pnas.0830918100.
146. Chen, J. Estimated yield of double-strand breaks from internal exposure to tritium / J. Chen // Radiat Environ Biophys. – 2012. – V. 51. – P. 295-302. – DOI/10.1007/s00411-012-0424-y.
147. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblast / S. Grudzenski, A. Raths, S. Conrad [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – V. 107. – № 32. – P. 14205–14210. – DOI/10.1073/pnas.1002213107.
148. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage / S. J. Collis, H. M. Schwaninger, A. J. Ntambi [et al.] // J Biol Cem. – 2004. – V. 279. – P. 49624-49632.
149. Газиев, А. И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации / А. И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51. – № 51. – С. 512-529.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель генерального  
директора  
ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна»  
Бушманов А.Ю.

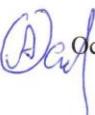
«17» февраля 2022 г

## АКТ

о внедрении результатов диссертации Родневой Софьи Михайловны в научно-исследовательскую деятельность отдела Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Родневой Софьи Михайловны на тему «Закономерности изменений количества фокусов белков репарации ДНК в соматических клетках млекопитающих при поступлении различных соединений трития с низкой активностью» внедрены в научно-исследовательскую деятельность отдела Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины при исследовании последствий воздействия инкорпорированных радионуклидов. Применение предложенной адекватной и рациональной методики дозиметрии изотопов в ядрах клеток млекопитающих важно для дальнейшего изучения воздействия радионуклидов, особенно в случаях хронического облучения. Проведенные оценки и расчеты позволяют в дальнейших исследованиях оценить опасность для здоровья человека низкоэнергетического электронного излучения радионуклидов непосредственно в клетках тканей. Количественное определение фокусов белков репарации ДНК при воздействии разных соединений с тритием с низкой радиоактивностью может быть использовано для оценки опасности облучения в малых дозах. Полученные зависимости количества фокусов белков репарации от поглощенных ядрами доз трития и их интерпретации необходимо в дальнейшем учитывать в процессе совершенствования методов радиационной биодозиметрии.

Заведующий отделом  
Экспериментальной радиобиологии  
и радиационной медицины  
ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна»  
д.б.н., профессор РАН

 Осипов А.Н.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность руководителю диссертационной работы профессору РАН Осипову Андреяну Николаевичу за помощь, чуткое руководство и поддержку при выполнении диссертационной работы. Выражаю признательность и благодарность заведующему лабораторией Радиационного канцерогенеза и токсикологии к.б.н. Гурьеву Денису Владимировичу и заведующей лабораторией Радиационной биофизики к.б.н. Воробьевой Наталье Юрьевне и их сотрудникам за помощь в организации и проведении радиобиологических экспериментов на клетках и крысах. Я очень признателна заведующему лабораторией Радиационной безопасности персонала д.м.н. Барчукову Валерию Гавриловичу и его сотрудникам за радиометрическое сопровождение экспериментов.