

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

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна"

Научный руководитель:

Осипов Андреян Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Официальные оппоненты:

Крышев Александр Иванович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией Эколого-геофизического моделирования и анализа риска Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-производственное объединение «Тайфун»» Росгидромета

Кузьмина Нина Станиславовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Экологической генетики Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук

Ведущая организация:

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Южно-Уральский федеральный научно-клинический центр медицинской биофизики» ФМБА России

Защита диссертации состоится «11» сентября 2025 г. в 10 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета 68.1.003.01 по адресу: 123098, Москва, ул. Живописная, д. 46, стр. 8, Конференц зал, тел. +7 (495) 190-96-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, и на сайте: <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/dissertation-council>

Автореферат разослан «15» июля 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Шандала Н.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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 (в основном тритий-протиевой воды – НТО), либо в форме органически связанного трития (ОСТ) в белках, нуклеиновых кислотах, липидах и сахарах.

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. Потенциальная токсичность трития зависит от его клеточной локализации и удержания в организме. Существует неопределенность, связанная с потенциальным воздействием трития на здоровье, а также в количественной оценке и понимании механизмов воздействия различных молекулярных соединений с тритием на биологические структуры. Измеренные экспериментально для трития значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) имеют широкий диапазон от 0,4 до 8.

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. Более точная дозиметрия должна учитывать биокинетику поступающих соединений в организм и размер выбранной биологической цели.

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 удельных активностей и, соответственно, мощностей доз, которые необходимы для получения острой летальности, индукции канцерогенеза, а также тератогенных, репродуктивных и цитогенетических эффектов. В результате полученные дозы от трития на несколько порядков превышают оценку средней эффективной дозы для населения и персонала.

Одной из проблем в экспериментах является вопрос дозиметрии соединений с тритием в различных типах клеток. 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.

Эксперименты показывают, что в зависимости от включения атома трития в молекулы воды или органические молекулярные структуры, радиационные биологические эффекты будут существенно различаться. Несмотря на обширные исследования биологического действия трития, есть неопределенность в количественной оценке риска слабого и/или длительного радиационного воздействия. Работ по исследованию эффектов от низких уровней мощностей доз трития с НТО и ОСТ относительно немного в связи со слабым биологическим откликом. Использование высокочувствительного иммуноцитохимического анализа количества фокусов белков репарации ДНК позволяет оценить риск от низких уровней мощностей доз трития при его включении в различные органические и неорганические соединения.

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 (γ H2AX, 53BP1 и pATM) в зависимости от поглощенной дозы ионизирующего излучения в ядрах мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, инкубированных с ^3H -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 (γ H2AX) в фибробластах легкого человека (линия MRC-5) при инкубации в течение 24 ч в среде, содержащей ^3H -тимидин или меченные ^3H -аминокислоты (глицин, аланин, пролин) с объемными радиоактивностями от 100 до 400 МБк/л.
4. Исследовать изменения количества фокусов белков репарации (γ H2AX) в клетках селезенки и частоты полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) костного мозга с микроядрами у крыс *Wistar*, получавших в течение 28 суток с питьевой водой ^3H -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 ^3H -тимидина) при анализе фокусов систем репарации (γH2AX , 53BP1 и pATM) установлены различия в процессах репарации ДР ДНК при воздействии НТО и ^3H -тимидина, 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 клеточных 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 им. 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 костного мозга с микроядрами;
- 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 соответствуют паспорту специальности 1.5.1. Радиобиология, в частности к пунктам 1; 3; 5.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе 1 представлен обзор литературы по исследованиям воздействия соединений трития на клеточном уровне, в котором освещены следующие вопросы: 1) экспериментальные исследования на клетках *in vitro*, включающие их гибель и задержку пролиферации, мутагенные эффекты, хромосомные aberrации, индукцию микроядер и фокусов белков-маркеров ДР ДНК; 2) экспериментальные исследования *in vivo*, включающие основные результаты ранних и современных исследований воздействия трития на животных, а также биокинетики и метаболизма трития в их организме. Из анализа литературы следует значительная зависимость клеточных эффектов от химической формы соединений с тритием и необходимость исследований клеточных реакций на воздействие небольших мощностей доз трития на клеточном уровне.

Глава 2. Дозиметрия соединений с тритием

Во всех предыдущих экспериментальных исследованиях с тритием в целях установления зависимости «доза-эффект» в клетках используется

стандартная упрощенная формула, основанная на гипотезе однородности распределения трития в клетках. Формула содержит также предположение, что концентрацию энергии трития в веществе можно количественно корректно определить через среднюю энергию его излучения. В случае неоднородного распределения в среде, клетке и клеточном ядре стандартная формула уже некорректна. Кроме того, при распаде трития, энергия распределяется между бета-частицей и антинейтрино случайным образом, следовательно, соответствующее электронное излучение имеет спектральное распределение, определяющее вероятность (частоту) излучения электрона определенной энергии. Поэтому в диссертации предлагается использовать методику дозиметрии трития, учитывающую спектральный энергетический состав при распаде трития и апробированные полуаналитические методы расчета доли энергии электронов, поглощаемой в целевой области. В соответствии с общепринятыми представлениями, большинство генотоксических биологических эффектов от радиации обусловлено нарушениями структуры ДНК ядра клетки, поэтому в качестве целевого объема выбирается объем клеточного ядра.

Предлагаемая методика оценки расчета поглощенных доз ядрами клеток использует:

- метод определения поглощенной дозы (S -значений) в области мишени (ядре клетки) от моноэнергетического электрона в области источника излучения (единичный распад трития в ядре и/или цитоплазме клетки);
- предположение о сферической симметрии областей мишени и источника излучения;
- спектральное распределение бета-излучения трития, которое определяет вероятность (частоту) излучения электрона определенной энергии от 0 до 18 кэВ;
- способ определения числа распадов трития в ядре и цитоплазме клетки.

На основе проведенного анализа различных методов расчета доз от трития на клеточном уровне, принято решение об использовании

апробированного метода Комитета по дозам внутреннего медицинского облучения Общества ядерной медицины (Medical Internal Radiation Dose – MIRD) для расчета средней поглощенной дозы в области мишени на единицу активности (S-значений).

В главе представлены необходимые для расчетов формулы, учитывающие изменение энергии электронов с расстоянием, а также доли энергии излучаемой из области источника и поглощаемой в целевой области. При этом, для случая трития предложено использовать аналитические формулы для определения длины пути и глубины проникновения электронов низких энергий. Собственные расчеты S-значений моноэнергетических электронов (1-18 кэВ) сравниваются с представленными в литературе расчетами, как для случая сферической симметрии, так и для случая эллипсоидальной формы ядра и клетки.

Далее представлены собственные расчеты S-значений для трития с учетом вероятностей появления моноэнергетических электронов и в зависимости от размеров ядер и клеток. Собственные расчеты для трития согласуются с точностью до 5% с S-значениями, полученных в ряде работ по моделированию распространения электронов в веществе с использованием современных численных методов Монте-Карло.

Полная поглощенная доза ядром клетки получается умножением соответствующего S-значения на число распадов трития в ядре и цитоплазме клетки. При этом следует принимать во внимание клеточный отклик на радиацию, определяемый функцией восстановления клеточного повреждения. В случае исследования количества разрывов ДНК и их белков репарации, в качестве функции восстановления клеточного отклика от радиации предлагается использовать аппроксимацию литературных экспериментальных данных двумя экспоненциальными зависимостями, отражающими быстрый и медленный процесс репарации ДР ДНК.

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

При хроническом воздействии радиации большая часть клеточных повреждений успевает восстановиться к концу периода облучения и измеряемый клеточный эффект будет только от распадов трития, произошедших в конце периода инкубации с соединениями трития. В связи с этим, вводится понятие «остаточной» дозы, т. е. дозы, поглощенной ядром клетки с учетом числа распадов трития в ядре и цитоплазме клетки в зависимости от функции репарации ДР ДНК от времени.

В конце главы отмечены особенности кинетики и метаболизма соединений с тритием в организме животных и представлены необходимые для оценки дозиметрии удельные активности НТО и ОСТ в различных тканях крыс в зависимости от радиоактивности трития в потребляемой крысами питьевой воде.

Таким образом, изложенную в главе методику оценки поглощенных доз в клетках в зависимости от размера клеточных структур и распределения источников излучения можно применить к определению зависимостей «доза-эффект» при изучении закономерностей изменений количества фокусов белков репарации ДР ДНК в клетках млекопитающих при воздействии НТО и ОСТ даже при единичных распадах трития в клетках.

Глава 3. Материалы и методы экспериментов

3.1 Эксперименты *in vitro*

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

В экспериментах с ^3H -тимидином и НТО использовалась первичная культура МСК костного мозга человека 5–6 пассажа, полученную из коллекции ООО «БиолоТ» (Россия).

В экспериментах с ^3H -тимидином и ^3H -аминокислотами (^3H -аланин, ^3H -глицин, ^3H -пролин) использовалась клеточная линия MRC-5 – хорошо

охарактеризованные нормальные фибробласты человека, одобренные для радиобиологических исследований.

Последовательность экспериментов состояла из нескольких 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 CO_2 -инкубатора. Конечная объемная радиоактивность составила 100, 200, 300 и 400 МБк/л.

1.1 Предварительно подготовленную культуру клеток – 0,5 мл клеточной суспензии – высаживают на покровные стекла, помещенные в чашки Петри 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 Клетки инкубируются в течение 24 часов в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C и концентрации CO_2 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 Клетки инкубируются в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C и концентрации CO_2 5 %, в течение необходимого интервала времени.

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 подсчета количества фокусов γH2AX , 53BP1 и АТМ с помощью люминесцентного микроскопа, оснащенного видеокамерой высокого разрешения. Анализировалось не менее 300 клеток на точку.

С целью измерения удельной радиоактивности трития (в клетках, ядрах и ДНК), МСК инкубировали в полной культуральной среде с добавлением ^3H -тимидина и НТО с объемной радиоактивностью 79,3 МБк/л в течение 24

ч. 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).

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*

В исследовании использованы 18 крыс-самцов Wistar, имеющих массу тела 371 ± 26 г. Животных разделили на 3 группы: «Контроль», «НТО» и « ^3H -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 ^3H -тимидин) с объемной активностью 200 ± 11 кБк/л. Объем потребляемой жидкости фиксировали ежедневно. При аутопсии крыс на 28 сутки эксперимента от каждой крысы брали костный мозг и селезенку.

Определяли уровень повреждений ДНК (фокусы γH2AX) в клетках селезенки крыс, получавших в течение 28 суток с питьем НТО или ^3H -тимидин с объемной активностью 200 кБк/л. Спленоциты выделяли путём механической гомогенизации селезенки. Далее проводилось иммуноцитохимическое окрашивание. Подсчет количества фокусов проводился вручную. Анализировалось не менее 500 клеток на крысу (не менее 3 тысяч клеток на экспериментальную группу).

Для подсчета микроядер были подготовлены образцы клеток костного мозга. При подготовке препаратов проводили трепанационную биопсию, мазки фиксировали и окрашивали ацетоорсеином-светлым зеленым. Использовался микроскоп Olympus CH30 при общем увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией. Анализировали по 1000 клеток костного мозга от каждого животного.

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 χ^2 . Отличия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1 Результаты радиобиологических экспериментов *in vitro*

Результаты исследований с МСК

Радиоактивность трития измерялась в МСК человека, инкубированных с ^3H -тимидином или НТО. Исходные измерения радиоактивности были пересчитаны для одиночных клеток, ядер и ДНК и также представлены в таблице 1 как среднее число распадов в мин. При расчете радиоактивности на одно ДНК учитывается масса ДНК в 6,0 пикограмм.

Таблица 1 – Результаты измерения радиоактивности и анализа включения ^3H -тимидина и НТО в клетках, ядрах и ДНК в МСК человека при удельной 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
^3H -тимидин	17267±1960	5816±741	930±135
Соединение	Число распадов на клетку в мин	Число распадов на ядро в мин	Число распадов на ДНК в мин
НТО	0,0119±0,0016	0,0019±0,0003	0,0022±0,0007
^3H -тимидин	1,04±0,12	0,35±0,04	0,33±0,05

Измерения радиоактивности и оценка числа распадов трития показывают высокую скорость включения ^3H -тимидина по отношению к НТО в ДНК клеток. Скорость распада трития на ядро и ДНК у ^3H -тимидина

почти одинакова, что подтверждает теоретические представления, что фактически весь ^3H -тимидин в ядре включается в состав ДНК.

Измерение радиоактивности непосредственно для ядер и клеток позволяет определить число распадов трития (^3H) в единицу времени. В экспериментах по анализу количества фокусов представляет интерес поглощенная доза трития (^3H) за 24 часа и ее оценка, учитывающая эффект репарации ДР ДНК («остаточная» поглощенная доза). Расчет количества распадов трития отдельно в ядре и цитоплазме проводился в предположении, что функция активности от времени у НТО постоянная, а у ^3H -тимидина линейно меняется со временем. При этом при оценке «остаточной» поглощенной дозы ядром клетки учитывается двухкомпонентная экспоненциальная аппроксимация процесса репарации.

Поглощенная доза ядром МСК на один распад (S-значение) трития непосредственно в ядре (1,38 мГр) и цитоплазме (0,065 мГр) определяется в соответствии методикой, изложенной в главе 2. Диаметр ядер и клеток МСК составляет соответственно в 10 и 18 мкм.

Анализ количества радиационно-индуцированных фокусов γH2AX , 53BP1, pATM проводился в ядрах МСК, инкубированных с ^3H -тимидином и НТО в течение 24 ч. Полученные зависимости хорошо описываются линейным приближением $y = b + ax$, где y – количество фокусов в клеточном ядре, а x – объемная радиоактивность (МБк/л) или поглощенная доза ядром клетки (Гр и мГр).

Комплексное представление среднего количества фокусов γH2AX , 53BP1 и pATM при инкубации с ^3H -тимидином и НТО показано на рисунке 1, соответствующие коэффициенты линейной зависимости от активности в среде в таблице 2. На рисунках 2 и 3 представлено изменение среднего количества фокусов γH2AX , 53BP1 и pATM в зависимости от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч и от «остаточной» дозы (в скобках) при инкубации с ^3H -тимидином и НТО, а коэффициенты в таблицах 3 и 4.

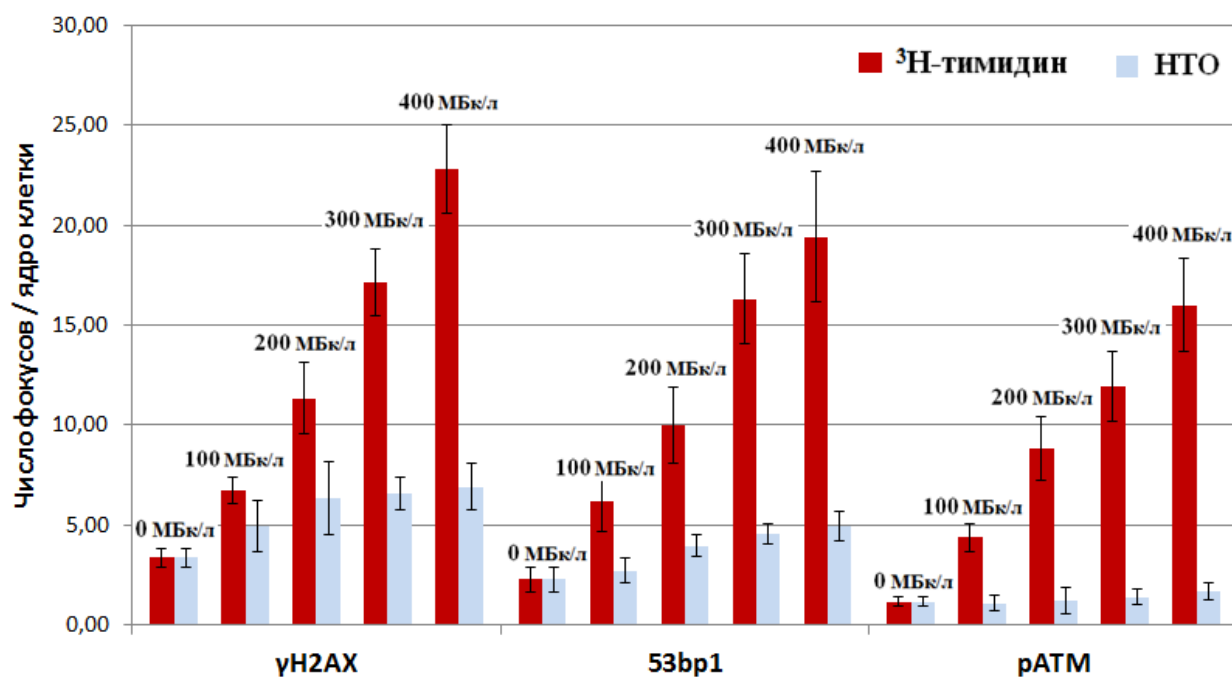


Рисунок 1 – Количество фокусов в ядрах МСК от радиоактивности в среде с ³H-тимидином и НТО

Таблица 2 – Коэффициенты линейной зависимости количества фокусов от радиоактивности в среде (МБк/л) с ³H-тимидином и НТО

Фокусы	³ H-тимидин		НТО	
	a	b	a	b
γH2AX	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

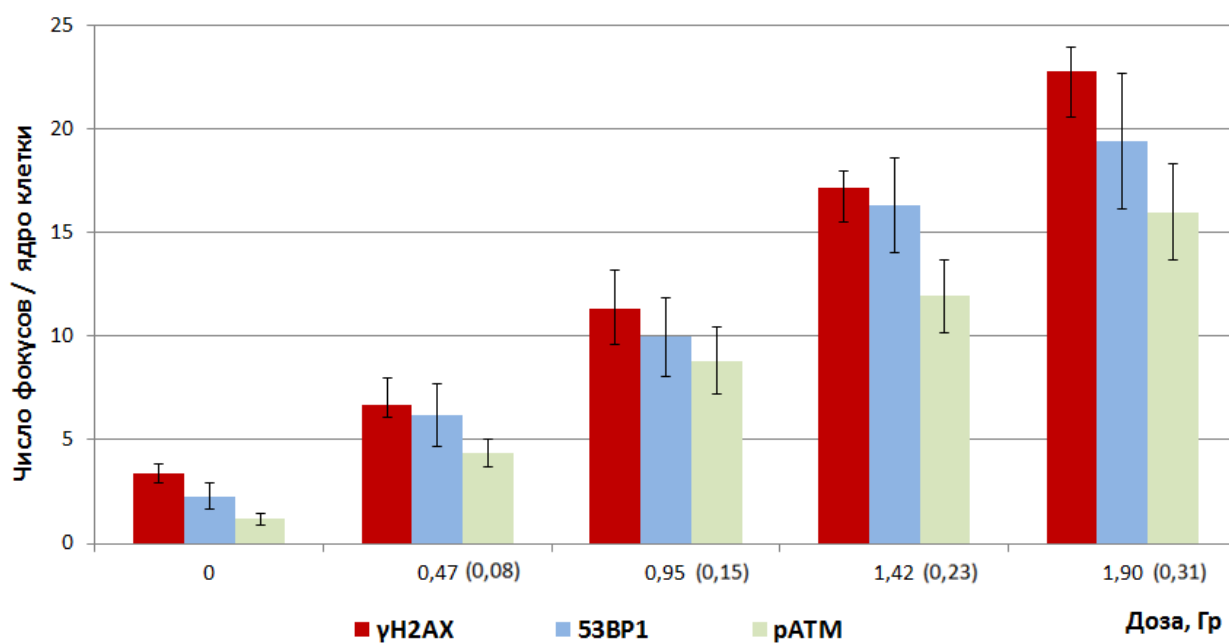


Рисунок 2 – Количество фокусов в ядрах МСК от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с ^3H -тимидином

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

Фокусы	Доза за 24 ч		Доза «остаточная»	
	a	b	a	b
γH2AX	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

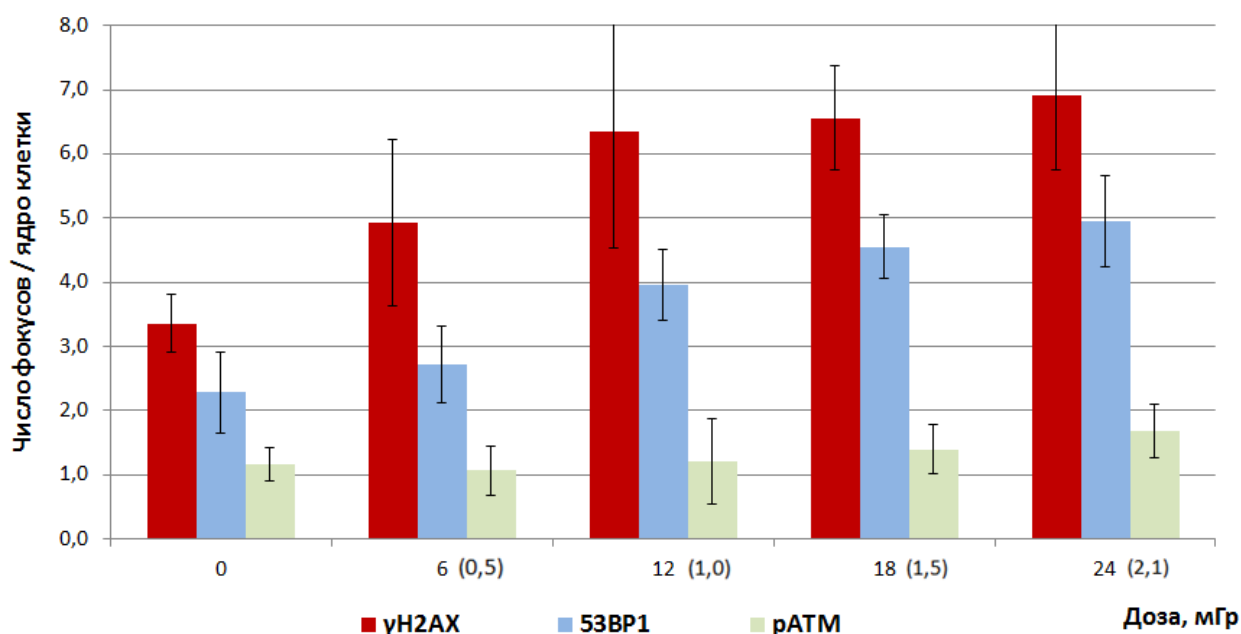


Рисунок 3 – Количество фокусов в ядрах МСК от поглощенной дозы ядром МСК за 24 ч при инкубации с НТО

Таблица 4 – 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
γH2AX	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 удельных радиоактивностей 100-400 МБк/л количественный выход фокусов γH2AX, 53BP1, pATM соответственно в 5,6; 6,2; 26,4 раза выше при воздействии ³H-тимидина, чем при воздействии НТО. Поглощенные дозы от ³H-тимидина превышают в 80 раз дозы от НТО при инкубации клеток с одинаковой удельной радиоактивностью в течение 24 ч, что обусловлено более высокой в 180 раз активностью ³H-тимидина в ядрах клеток, по сравнению с НТО по итогам 24 ч инкубации в среде. Поглощенные «остаточные» дозы от ³H-тимидина превышают в 150 раз «остаточные» дозы от НТО при тех же условиях.

Результаты исследований с MRC-5

С целью сравнительного анализа повреждений ДНК было проведено исследование по определению количества фокусов γ H2AX, в ядрах фибробластов легкого человека (MRC-5), инкубированных с 3 H-тимидином и 3 H-аминокислотами. Эксперименты по сравнительному количественному анализу фокусов γ 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 удельной радиоактивностью, позволили установить, что зависимость количества фокусов γ 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 γ H2AX у всех соединений. Зависимости «активность-эффект» хорошо аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов, x – радиоактивность в МБк/л. На рисунке 4 представлены количественные данные фокусов γ H2AX в клеточном ядре в зависимости объемной радиоактивности 3 H-тимидина и 3 H-аминокислот, а коэффициенты линейной зависимости в таблице 5.

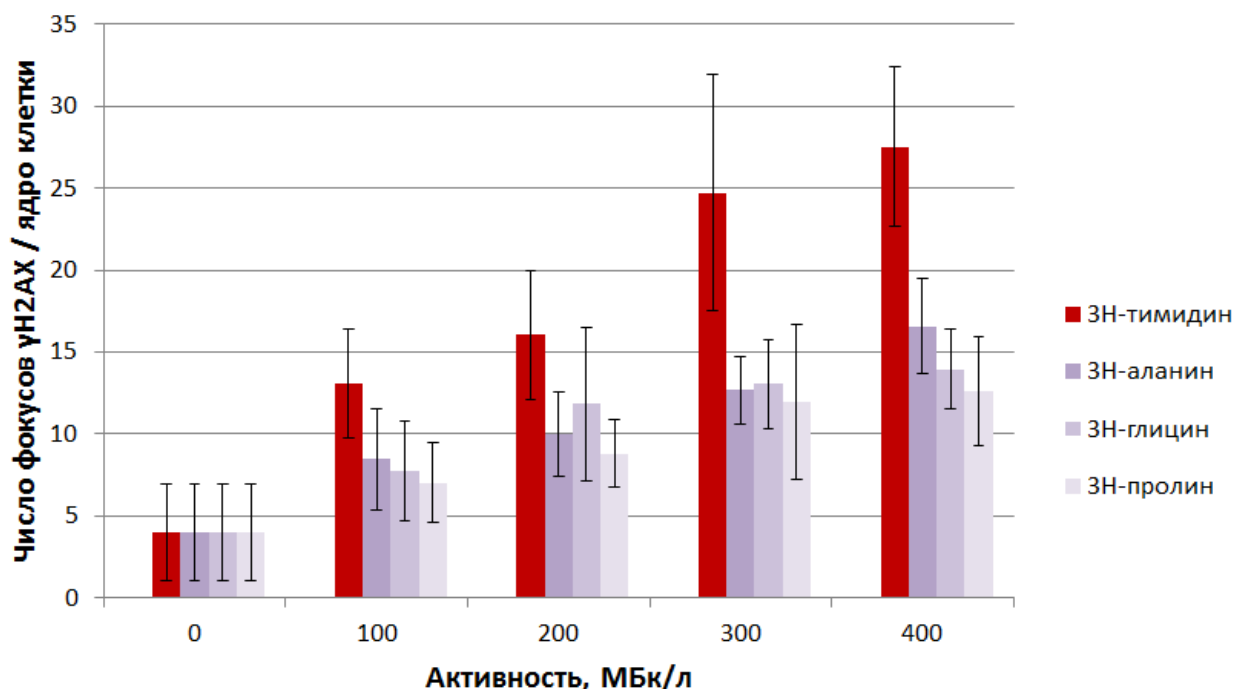


Рисунок 4 – Количество фокусов γ H2AX в клетках MRC-5 в зависимости объемной радиоактивности 3 H-тимидина и 3 H-аминокислот

Таблица 5 – Коэффициенты линейной зависимости у фокусов γ H2AX от радиоактивности в среде (МБк/л)

^3H -тимидин		^3H -аланин		^3H -глицин		^3H -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 ^3H -тимидин или меченные тритием -глицин, -аланин, -пролин ($p < 0.001$, $z = 4.5$, 4.47 , 5.66 , соответственно). В целом, в пересчете на единицу удельной радиоактивности ^3H -тимидин вызывает более чем в 2 раза большее количество фокусов ДР ДНК, чем меченые тритием аминокислоты.

С целью сравнения эффектов в ядрах клеток проводился анализ молекулярного состава хроматина. Количественный состав аминокислот гистонов H1, H2A, H2B, H3, H4 и негистонового белка HMGB рассчитывался с использованием открытых баз данных состава белков Национального центра биотехнологической информации США и UniProt.

Наш анализ количества фокусов γ H2AX, в ядрах фибробластов легкого человека (MRC-5) при воздействии ^3H -аминокислот показал, что наибольшее количество ДР ДНК формируется в тех клеточных культурах, которые инкубировались в среде с добавлением ^3H -аланина, среднее с ^3H -глицином, наименьшее количество с ^3H -пролином. Эти экспериментальные данные подтверждаются оценками сравнения количественного аминокислотного состава белков хроматина: аланин (11,1%), глицин (8,0%) и пролин (4,1%). Поэтому можно предположить, что клеточные эффекты действия ^3H -аминокислот зависят от количества их немеченых гомологов в составе в хроматина.

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 ^3H -тимидина в растворе питьевой воды. При хроническом поступлении с питьем НТО и ^3H -тимидина 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 γH2AX в спленоцитах крыс;
- значения ПХЭ костного мозга с микроядрами.

Расчетные значения доз в тканях органов в предположении о равномерном распределении трития очень малы (суммарно 150-300 мкГр за 4 недели). Оценка дозиметрии в случае слабой радиоактивности трития не может быть проведена с учетом применяемых дозиметрических методов, так как тритий будет содержаться в относительно небольшом проценте клеток. Фактически, в пораженных клетках за исследуемый период произойдет только один распад трития, и по нашим оценкам значения доз в ядрах отдельных клеток не будут превышать 5 мГр.

Проводился подсчет количества фокусов γH2AX в клетках селезенки крыс каждой группы НТО, ^3H -тимидин, контроль. Относительное число клеток с фокусами составило соответственно в каждой группе 0,06, 0,11 и 0,04, а соответственное количество фокусов на одну клетку было $0,16 \pm 0,01$, $0,27 \pm 0,01$ и $0,09 \pm 0,01$.

В экспериментах *in vivo* на крысах при анализе фокусов репарации ДР ДНК γH2AX в клетках селезенки установлено увеличение их количества относительно контроля, как при воздействии НТО, так и при воздействии ^3H -тимидина. Более выраженное повреждающее действие на образование ДР ДНК оказывает ^3H -тимидин, чем НТО. Отмечается только небольшое число

пораженных тритием клеток по сравнению с общим количеством спленоцитов.

Цитогенетический эффект соединений трития рассматривался у крыс при пероральном приеме растворов с ^3H -тимидином и НТО. Анализ частоты ПХЭ с микроядрами представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Генотоксические эффекты ПХЭ костного мозга крыс при приеме питьевой воды содержащей НТО и ^3H -тимидин с 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	$5,8 \pm 1,1$	$6,5 \pm 1,2$	$0,35 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$
^3H -тимидин	$5,2 \pm 1,4$	$9,0 \pm 1,6^*$	$0,39 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,03$
Контроль	$4,5 \pm 1,2$	$4,2 \pm 0,8$	$0,35 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,03$

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

** $M \pm \sigma$ – средняя арифметическая \pm стандартное отклонение

Различия по критерию χ^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 ^3H -тимидином.

В *обсуждении* отмечаются основные результаты экспериментов и предположения об их молекулярных механизмах. 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. Представлено сравнение коэффициентов линейной аппроксимации количества фокусов в зависимости от поглощенной дозы ядром МСК при инкубации с ^3H -тимидином и НТО с соответствующими коэффициентами при облучении фотонами в том же диапазоне доз. Отмечается некорректность линейной аппроксимации данных на уровне низких доз (1-20 мГр) при экстраполяции значений количества фокусов на более высокие диапазоны доз (свыше 0,1 Гр). В области сверхмалых доз (до 10 мГр) от внутреннего облучения радионуклидом трития при НТО наблюдаются отличные от воздействия ^3H -тимидина процессы репарации.

В заключении диссертации изложены итоги выполненного исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, а также *выводы* о проделанной работе:

1. Установлена линейная зависимость между количеством фокусов белков репарации ДНК и радиоактивностью трития в культуральной среде (100-400 МБк/л) в несинхронизированных МСК ($\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM}$) и популяциях фибробластов легкого человека MRC-5 (γH2AX).
2. Расчет поглощенной дозы ядрами МСК показал превышение дозы от ^3H -тимидина в 80-150 раз по отношению к НТО, что объясняет большую разницу в количестве фокусов у этих соединений в 5,6 (γH2AX), 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 ^3H -тимидин), а также с учетом времени репарации («остаточная» доза: 0,4-2,0 мГр НТО, 0,06-0,31 Гр ^3H -тимидин).
4. Выявлено низкое количество pATM по отношению к γH2AX (20%) и 53BP1 (30%) при инкубации с НТО, что объясняется слабым фосфорилированием белка-трансдуктора ATM при поглощенных дозах ядрами МСК в пределах до 10 мГр.

5. В фибробластах легкого человека MRC-5 при инкубации в течение 24 ч ^3H -тимидин вызывает в 2 раза большее количество фокусов γH2AX , чем ^3H -аминокислоты, а у ^3H -аланина на 30% больше по сравнению с ^3H -пролином.
6. Эксперименты с крысами, потребляющих питьевую воду с ^3H -тимидином и НТО с объемной активностью 200 кБк/л в течение 28 дней, свидетельствуют о слабых эффектах образования фокусов γH2AX (^3H -тимидин – $0,27 \pm 0,01$, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах цитирования Web of Science, Scopus:

1. Rodneva S. M. Comparative study of the γH2AX 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.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – V. 172. – № 2. – P. 245-249. – DOI 10.1007/s10517-021-05370-6/. – Web of Science. Scopus. Q3. Участие в публикации – 70%.
2. 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. – РИНЦ. Scopus. Q4. Участие в публикации – 85 %.
3. 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. – РИНЦ. Scopus. Q4. Участие в публикации – 85 %.
4. Роднева С. М. Генотоксический эффект оксида трития и ^3H -тимидина 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. – РИНЦ. Scopus. Q4. Участие в публикации – 70%

Тезисы конференций:

5. Роднева С. М. Некоторые иммуноцитохимические и цитогенетические показатели крыс Wistar после хронического воздействия НТО и ^3H -тимидина / С. М. Роднева, Л. П. Сычева, Н. М. Сметанина [и др.] // Юбилейная международная научно-практическая конференция «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей», Москва, 2021. Тезисы докладов юбилейной международной научно-практической конференции. – Москва, 16-17 ноября 2021 года. – С. 233-234.

6. Роднева С. М. Сравнительные количественные исследования фокусов γH2AX в фибробластах легкого эмбриона человека, инкубированных в средах, содержащих меченные тритием тимидин или аминокислоты / С. М. Роднева, А. А. Осипов, Д. В. Гурьев [и др.] // VIII Съезд по радиационным исследованиям. Тезисы докладов. – Москва, 12-15 октября 2021 года. – С. 72.

7. Роднева С. М. Оценка генетических нарушений у крыс после длительного поступления с питьевой водой НТО и ^3H -тимидина с объемной активностью 500 кБк/л / С. М. Роднева, А. А. Максимов, Е. С. Жорова [и др.] // Материалы IV Национального конгресса с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды, посвященного 145-летию со дня рождения А. Н. Сысина. Сборник тезисов. – Тверь, 16-18 октября 2024 года. – С.116-117.

8. Максимов А. А. Генотоксический эффект НТО и ^3H -тимидина при длительном поступлении в организм крыс с питьевой водой и объемной активности 200 кБк/л / А. А. Максимов, С. М. Роднева, Е. С. Жорова [и др.] // Актуальные проблемы радиационной биологии. Модификация радиационноиндуцированных эффектов. Материалы конференции – Дубна, 16-18 октября 2024 года. – С. 131-132.