

УДК 577.3

СРАВНЕНИЕ ДИНАМИКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИХ ТОТАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ИОНАМИ УГЛЕРОДА В ПИКЕ БРЭГГА ИЛИ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ

© 2023 г. Е.А. Кузнецова*, #, О.М. Розанова*, Е.Н. Смирнова*, С.И. Глухов*, Т.В. Сирота*, Т.А. Белякова**, Н.П. Сирота*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

**Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева,
Академический пр., 2/110, Протвино, Московская область, 142281, Россия

#E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.09.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

В работе определены: выживаемость мышей, облученных ускоренными ионами углерода (450 МэВ/нуклон) в пике Брэгга или рентгеновским излучением в дозе 6,5 Гр; методом ДНК-комет — уровни повреждений ДНК (%TDNA) в лейкоцитах крови мышей за сутки до и через 1–23 сут после облучения ионами углерода и через 1–28 сут после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе. Обнаружено большее повреждающее действие ионов углерода по сравнению с рентгеновскими лучами по критериям выживаемости и %TDNA, а также у индивидуальных животных существенные вариации %TDNA, которые, по-видимому, могут служить причиной индивидуальных различий при развитии нестабильности генома в отдаленные сроки. Можно полагать, что более высокий %TDNA лейкоцитов после облучения ионами углерода по сравнению с рентгеновским излучением, его больший диапазон и несинхронность изменений у индивидуумов в пострадиационном периоде связаны с возникновением кластерных повреждений в ДНК и дисфункцией митохондрий, а также обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами. Полученные результаты указывают на необходимость оценки состояния лейкоцитов крови животных с гетерогенным генетическим фоном методом ДНК-комет перед облучением для формирования группы с близкими значениями %TDNA. Выявленные различия у индивидуальных лабораторных животных требуют дальнейшего изучения для совершенствования животных моделей в свете развития персонализированной биомедицины.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, рентгеновское излучение, ускоренные ионы углерода, повреждения ДНК лейкоцитов, индивидуальные животные.

DOI: 10.31857/S000630292301012X, EDN: OALBXD

Изучение биологических эффектов ускоренных частиц на живые организмы связано с решением проблем космобиологии и медицины. Так, в ограниченном количестве специализированных клиник в качестве радиотерапии применяют облучение опухолей тяжелыми частицами, в частности, ионами углерода. Специфика передачи энергии ускоренных тяжелых частиц биологическим образцам заключается в максимальном выделении энергии в пике Брэгга, что вызывает глу-

бокие изменения структуры хроматина [1]. В отличие от пучка ускоренных частиц, направленного на локальный участок тела пациента, воздействие тяжелых заряженных частиц при пилотируемых космических полетах может осуществляться на весь организм. Высокоэнергетические частицы (10^6 – 10^{21} эВ) и фотоны из внеземных источников, находящихся внутри и вне нашей галактики, индуцируют повреждения ДНК культивируемых клеток и клеток крови космонавтов, даже несмотря на низкие дозы и небольшие мощности доз [2, 3]. Основным неблагоприятным эффектом действия ионизирующих излучений при радиотерапии и долговременных

Сокращения: %TDNA — уровень повреждений ДНК, ЛПЭ — линейная передача энергии, АФК — активные формы кислорода.

космических полетах является повышенный риск возникновения злокачественных новообразований [1, 4]. Поэтому изучение отдаленных биологических эффектов воздействия ускоренных частиц на моделях животных актуально для понимания последствий, как космических полетов, так и применяемых протоколов лечения онкологических пациентов. В качестве объекта радиобиологических исследований традиционно используют мышей, в частности, для выявления биологических эффектов облучения берут пробы крови. Использование крови мышей представляется интересным, поскольку основное количество лейкоцитов мыши — это лимфоциты, являющиеся клетками иммунной системы, с одной стороны, и наиболее радиочувствительными клетками крови, с другой. Результатом воздействия фотонов и ускоренных частиц является поражение клеточных структур, в частности, ДНК, в которой регистрируют различные повреждения — разрывы, повреждение или утрата оснований, сшивки; особенностью действия ускоренных ионов на клетки является индукция кластерных повреждений ДНК, то есть близко расположенных множественных нарушений структуры хромосомы [1, 5].

Одним из современных методов, выявляющих широкий спектр повреждений ДНК индивидуальных клеток (одно- и двухнитевые разрывы, апуриновые/апиримидиновые сайты, реализующиеся в разрывы ДНК при высоком pH), является щелочная версия метода ДНК-комет [6]. Метод является высокочувствительным, не требует большого количества биологического материала, что позволяет проводить мониторинг уровня повреждений ДНК клеток крови облученных животных в течение их жизни в разные сроки после облучения. Поскольку, как правило, в группе животных регистрируют средние значения изучаемых показателей, то в свете развития персонализированной биомедицины особый интерес также заключается в изучении показателей у индивидуальных животных на протяжении длительного пострадиационного периода.

Цель работы: оценить выживаемость и уровни повреждений ДНК (%TDNA) лейкоцитов крови у индивидуальных животных в отдаленные сроки после воздействия на мышей ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр, сравнить динамику изменений уровней повреждений ДНК лейкоцитов с таковой после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных мышей колонии SHK (масса 31–35 г, $n = 60$), полученных в фили-

але «Столбовая» НЦБМТ ФМБА, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская область) при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, естественном световом дне и свободным доступом к пище и воде. Мыши содержались в полипропиленовых клетках по 10 особей.

Облучение. Мышей, предварительно анестезированных смесью ксилазин–зоветила (Interchemie Werken, BV, Нидерланды; Virbac Sante Animale, Франция), облучали тотально в индивидуальных хорошо вентилируемых контейнерах на установке «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» НИЦ «Курчатовский институт» — ИФВЭ (Протвино, Московская обл.) — моноэнергетическим пучком ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр, как описано в работе [7]. Расчетная величина линейной передачи энергии (ЛПЭ) ионов углерода при позиционировании мышей в модифицированном пике Брэгга составляла 100 кэВ/мкм. Дозиметрию во время облучения проводили по показаниям монитора и ТЛД-дозиметров типа ММТ. Профили пучка и равномерность поперечного облучения контролировали с помощью радиохромной пленки EBТ-3 (Caf-Chromic, США). Параллельно другие группы мышей были облучены в дозе 6.5 Гр на рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» (ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН, Пушино, Московская обл.) при мощности дозы 1.12 Гр/мин, напряженности 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см, ЛПЭ = 2 кэВ/мкм. Дозиметрию проводили по методу Фрике в присутствии бензойной кислоты с помощью дозиметра VA-J-18.

Метод ДНК-комет. Для определения уровня повреждения ДНК в лейкоцитах крови у каждой мыши за сутки до, а также в разные периоды после облучения на протяжении 23–28 суток надрезали кончик хвоста, брали по 5 мкл крови и помещали в пробирки с фосфатно-солевым буфером, pH 7.2, содержащим 0.001 моль/л ЭДТА. Цельную кровь мышей разбавляли этим раствором в шесть раз. Слайды для анализа ДНК-комет готовили по методике [8] и анализировали под флуоресцентным микроскопом «ЛЮМАМ И-3» (ЛОМО, Санкт-Петербург). Для экспериментов *in vitro* из крови интактных мышей аналогичным образом готовили слайды, которые облучали на льду на рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» с той же мощностью дозы, как указано выше. Сразу после облучения слайды помещали в лизирующий раствор и проводили все процедуры согласно работе [8]. Изображения комет были сняты цифровой камерой CoolPix 995 (Nikon, Япония) и обработаны с помощью специально разработанного программного обеспечения, содержащего алгоритмы расчета стандартных параметров комет [9]. Уровень повреждения выражали в процентах

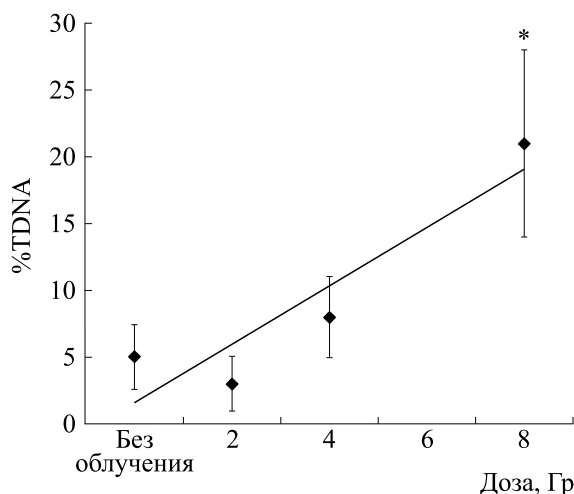


Рис. 1. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови после облучения рентгеновскими лучами слайдов, содержащих клетки крови, в диапазоне доз 0–8 Гр; * — достоверные отличия от необлученных ($p < 0.05$).

ДНК, содержащейся в хвосте кометы, относительно общего количества ядерной ДНК (%TDNA). Для каждой экспериментальной единицы анализировали по три слайда, фотографируя не менее 50 клеток на слайд, как описано в работе [10].

Определение выживаемости. Для определения 30-суточной выживаемости использовали 20 мышей, которые были разделены на две группы. Были проведены два независимых эксперимента. После облучения в течение месяца ежедневно учитывали гибель животных и по итогам наблюдения определяли 30-суточную выживаемость, динамику гибели и среднюю продолжительность жизни погибших мышей.

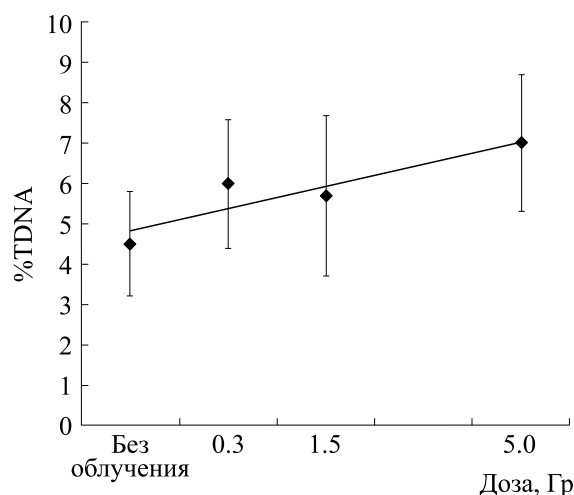


Рис. 2. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через сутки после воздействия на мышей рентгеновского излучения в диапазоне доз 0–5 Гр.

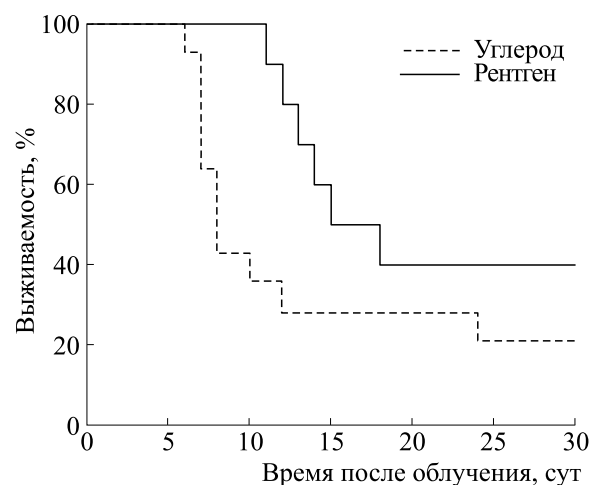


Рис. 3. Динамика выживаемости мышей после тотального облучения ионами углерода и рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр.

Статистическая обработка результатов. Анализ статистической достоверности отличий проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), расчет p -value достоверности уровней значимости производили методом последующего теста Турки (Turkey HSD *post-hoc* test), а также с использованием t -критерия Стьюдента. Показатели выживаемости мышей сравнивали с помощью непараметрических критериев: Гехана—Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-ти суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показана зависимость %TDNA лейкоцитов крови от дозы сразу после воздействия рентгеновского излучения на кровь мыши *in vitro*. Облучение клеток в дозах 0–8 Гр проводили в составе агарозных слайдов на льду для исключения репарации ДНК. Видно, что с увеличением дозы растут значения %TDNA.

На рис. 2 показана зависимость %TDNA лейкоцитов крови через сутки после облучения мышей рентгеновским излучением в диапазоне доз 0–5 Гр. Различия в уровнях остаточных повреждений ДНК при облучении лейкоцитов при этих дозах в условиях *in vivo* не были выявлены. При данной постановке эксперимента регистрировали лишь остаточные нерепарированные повреждения.

На рис. 3 представлены кривые выживаемости мышей, облученных в дозе 6.5 Гр в пике Брэгга ионами углерода и для сравнения — рентгеновским излучением. Основная гибель мышей при

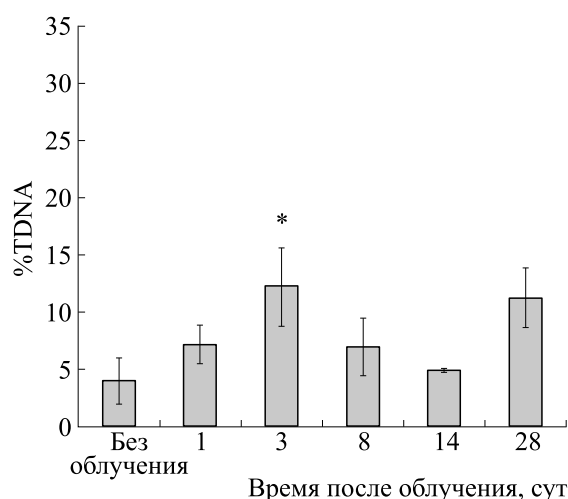


Рис. 4. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 сут после воздействия на мышей рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$); * — достоверные отличия от необлученных мышей ($p < 0.05$).

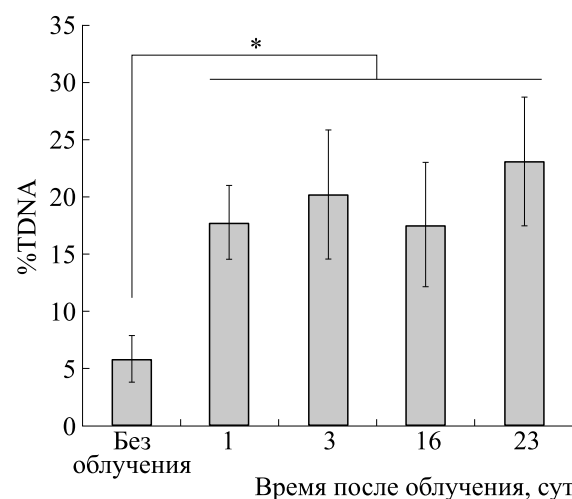


Рис. 5. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через 1–23 сут после облучения мышей ионами углерода в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$); * — достоверные отличия от необлученных мышей ($p < 0.05$).

облучении ионами углерода наблюдалась с шестых по девятые сутки в отличие от рентгеновского излучения, где животные начинали гибнуть только с двенадцатых суток, что может быть обусловлено разным характером течения лучевой болезни: развитие желудочно-кишечного синдрома после действия ионов углерода и костномозгового синдрома после рентгеновского излучения. В период развития острой лучевой болезни во всех группах наблюдалось прогрессивное снижение массы тела животных и угнетение двигательной активности. Максимальная потеря веса на 30% в группе мышей после рентгеновского излучения наблюдалась через 11–15 суток, а в группе, облученной ионами, критическое снижение веса наблюдалось уже на 5–7 сутки. Средняя продолжительность жизни погибших при облучении ионами углерода мышей составила 9 ± 3 суток, а при рентгеновском облучении — 16 ± 3 суток. Динамика гибели мышей после воздействия рентгеновских фотонов и ионов достоверно различалась ($p < 0.05$), и к 30 суткам при облучении ионами углерода выживаемость составила 21%, а для рентгеновского излучения — 40%.

В параллельных экспериментах изучали динамику изменения %TDNA лейкоцитов крови у выживших животных примерно в те же сроки после воздействия на мышей ионов углерода и рентгеновского излучения. На рис. 4 показана динамика изменений средних значений %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 суток после воздействия на мышей рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр. Как видно из этого рисунка, достоверные отличия %TDNA от контрольного уровня наблюдались на 3 сут после облучения. На рис. 5 показаны средние значения %TDNA лейкоцитов в течение периода 1–23 суток после облучения иона-

ми углерода. Видно, что уже через сутки %TDNA достоверно увеличивался по сравнению с таковым до облучения и оставался высоким вплоть до 23 суток ($p < 0.05$).

Поскольку нами выявлены резкие различия в динамике уровней %TDNA лейкоцитов крови, индуцированных рентгеновским и ионным излучениями, действие которых еще более значимо проявились по критерию выживаемости мышей, было интересно проанализировать индивидуальные вариации уровней повреждений ДНК у выживших мышей. На рис. 6 показана динамика индивидуальных изменений %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 суток после воздействия рентгеновского излучения. У всех мышей на третьи сут-

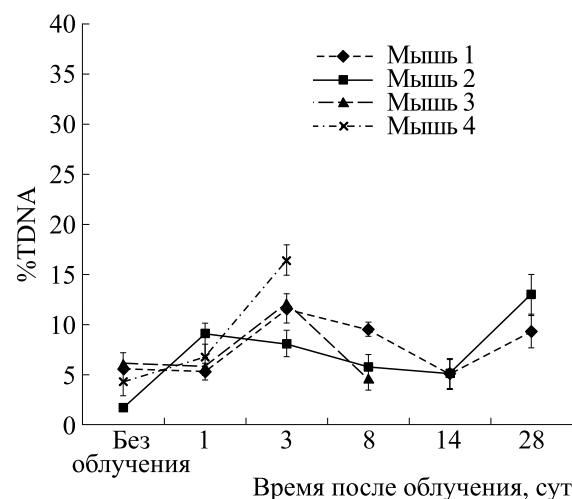


Рис. 6. Динамика изменений %TDNA у индивидуальных мышей через 1–28 сут после облучения рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр ($M \pm SEM$).

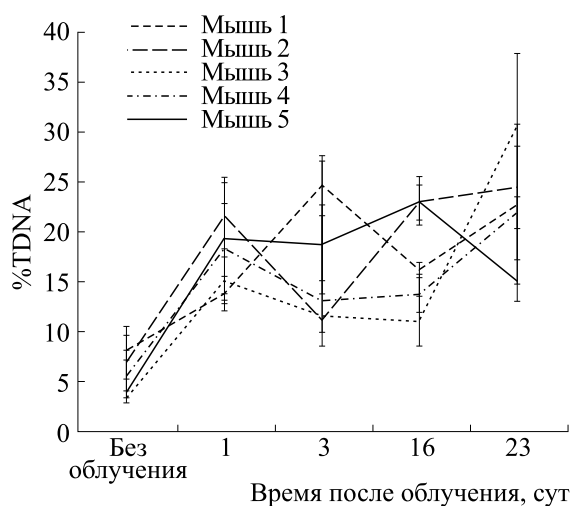


Рис. 7. Динамика изменений %TDNA у индивидуальных мышей через 1–23 сут после облучения ионами углерода в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$).

ки наблюдались достоверные отличия значений %TDNA от соответствующего контроля. Индивидуальная динамика изменений %TDNA у мышей, выживших к 28 суткам после облучения, была сходная. На рис. 7 показана динамика индивидуальных изменений %TDNA лейкоцитов крови на 1–23 сутки после облучения ионами углерода. Различия %TDNA на 16 сутки после облучения между мышами №№ 1 и 2, 2 и 3, 2 и 4, 3 и 5, а также на 23 сутки между мышами 2 и 4, 2 и 5, 3 и 5, 4 и 5 статистически достоверны ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования динамики изменений %TDNA у животных в отдаленные сроки (до месяца) после радиационного воздействия предварительно были проанализированы зависимости величин %TDNA лейкоцитов крови мышей от дозы рентгеновского излучения *in vitro* и *in vivo*, поскольку нужно было оценить возможности щелочной версии метода ДНК-комет для регистрации повреждений ДНК в этом типе клеток. В большинстве работ по определению молекулярных повреждений ДНК, выполненных этим методом, используются, как правило, культуры клеток, высокие дозы облучения, а при облучении животных повреждения регистрируются в короткие сроки после облучения (до 4–6 ч). Лишь в небольшом количестве работ регистрируют биологические эффекты воздействия тяжелых ионов в сильно отдаленные сроки — до одного года [11]. Кривая «доза–эффект» облученных рентгеновскими фотонами лейкоцитов *in vitro* имела линейный характер (рис. 1) и существенно отличалась от кривой, полученной при облучении мышей

in vivo (рис. 2), где уровень %TDNA практически не зависел от дозы. Это объясняется тем, что при облучении клеток в агарозных слайдах при 4°C процессы репарации ДНК практически отсутствовали, и регистрировался индуцированный облучением уровень повреждений ДНК. Через сутки после облучения мышей (рис. 2) регистрировались остаточные повреждения ДНК лейкоцитов после реализации как репарации ДНК, так и клеточного обновления. Известно, что в клетках через 20–24 ч после воздействия фотонов в основном заканчивается репарация всех типов повреждений ДНК [12]. Следует отметить, что как при облучении *in vitro*, так и *in vivo* наблюдались большие величины стандартного отклонения, что указывало на гетерогенность радиационного ответа клеток крови. Очевидно, что наблюдаемая гетерогенность ответа связана не с различным ответом субпопуляций лейкоцитов, поскольку, как было показано, лимфоциты и гранулоциты не различаются по уровню повреждений ДНК в интервале доз 0.93–5.43 Гр [13].

Влияние гетерогенности радиационного ответа у отдельных животных по критерию уровня повреждений ДНК в последующих экспериментах было проанализировано при действии облучений с разной ЛПЭ: рентгеновскими фотонами с ЛПЭ = 2 кэВ/мкм и ускоренными ионами углерода с ЛПЭ = 100 кэВ/мкм. Исходя из кривых на рис. 1 и 2, была выбрана доза 6.5 Гр, при которой изучали динамику изменений %TDNA как у индивидуумов, так и в группе, а также анализировали выживаемость мышей примерно в одни и те же сроки пострadiационного периода. Данные по 30-суточной выживаемости мышей, которая является базовой биологической характеристикой объекта и исследуемого излучения, демонстрируют значительно большее повреждающее действие ускоренных ионов углерода по сравнению с рентгеновским излучением (рис. 3) — за счет резкой гибели мышей в более ранние сроки после облучения ионами углерода, что согласуется с величиной и динамикой уровней повреждений ДНК, которые характеризуются повышением %TDNA относительно контроля при рентгеновском облучении на третьи сутки, а после воздействия ионов углерода — уже на первые сутки (рис. 4 и 5). Динамика изменений значений %TDNA на 3, 6–14 и 23–28 сутки в целом похожа при обоих видах облучения, что, по-видимому, обусловлено процессами клеточного обновления в органах и тканях, связанных с продукцией клеток крови и формированием иммунитета. Использование метода ДНК-комет для определения повреждений ДНК в клетках крови представляется важным для оценки лучевой реакции разных клеток в отдаленные сроки.

ленные сроки. Лейкоциты мышей представлены в основном лимфоцитами (считающимися наиболее радиочувствительными среди клеток крови), и более высокие (по сравнению с рентгеновским излучением) уровни повреждений ДНК лейкоцитов при воздействии ионов углерода, по-видимому, отражают в какой-то степени реакцию других активно делящихся и поэтому высокочувствительных клеток организма — кишечника и костного мозга, что может свидетельствовать о разнице в стадиях развивающейся после воздействия фотонов и ионов лучевой болезни — желудочно-кишечной или костномозговой.

Очевидно, что повышенный уровень %TDNA у ^{12}C -облученных мышей связан с особенностями воздействия ионов углерода, которые индуцируют многочисленные, сложные по структуре, расположенные близко друг к другу повреждения ДНК, трудно реparableемые или не реparableемые [5, 14]. Возможно, что репарация таких специфических повреждений ДНК не может в достаточной мере реализоваться в наблюдаемые после облучения углеродом сроки, что согласуется с данными литературы о механизмах и путях репарации повреждений при действии ионизирующих излучений с высокими значениями ЛПЭ [14].

Сохраняющийся высокий уровень повреждений ДНК через 23 суток после облучения ионами углерода может быть обусловлен не только сохранением нерепарированных и результатом ошибочной репарации сложных кластерных повреждений ДНК, но и атаками активных форм кислорода и азота (АФК/А), внутриклеточная генерация которых продолжается и в пострadiационном периоде. Например, в гамма-облученных фибробластах человека обнаружили дозозависимую продукцию АФК, уровень которых возрастал с третьих по седьмые сутки после облучения, как в цитоплазме клеток, так и в митохондриях [5]. Ранняя и поздняя генерация радиационно-индуцированных митохондриальных АФК/А опосредуют изменения числа копий митохондриальной ДНК, мутации и экспрессию генов, аутофагию и апоптоз, повреждение ядерной ДНК и нестабильность генома. Примечательно, что сохранение радиационных эффектов, приводящих к митохондриальной дисфункции в клетках-потомках, имеет серьезные последствия для жизнедеятельности клеток и организма [15]. Если при воздействии фотонами в основном генерируются высокорeакционные радикалы, то при облучении тяжелыми частицами увеличивается выход генотоксичных молекулярных продуктов, таких

как H_2O_2 . Электростатически нейтральные молекулы H_2O_2 легко проникают сквозь мембраны и повреждают клеточные органеллы [5]. Митохондрии, которые потребляют около 90% кислорода в организме и генерируют большую часть АФК, являются также одной из вероятных клеточных мишеней при облучении тяжелым ионами, поскольку расположены близко к ядру и занимают существенную долю объема клетки. Индуцированная ионами углерода генерация АФК может быть также обусловлена дисфункцией митохондрий, которая существенно зависит от характеристик генотоксического воздействия [16–18].

Следует отметить, что при анализе средних значений %TDNA в группе облученных мышей также регистрировались большие стандартные отклонения, что, по-видимому, связано с различиями в уровнях повреждений ДНК лейкоцитов у индивидуумов. Можно было предположить, что радиочувствительность мышей зависит от спонтанного уровня %TDNA у индивидуумов. Спонтанный уровень повреждений ДНК в клетках необлученных животных отражает физиологические процессы возникновения и репарации повреждений, поскольку ДНК постоянно подвергается окислению и спонтанной тепловой и гидролитической деградации в условиях нормального метаболизма организма [19]. Однако в наших экспериментах спонтанные уровни повреждений ДНК в лейкоцитах крови мышей не отличались существенной вариабельностью и были низкими — менее 10%. Динамика индивидуальных изменений %TDNA у мышей, выживших к 28 суткам после рентгеновского облучения, была сходная (рис. 6). В отличие от этого, при облучении ионами углерода наблюдались различия минимальных и максимальных значений %TDNA в одни и те же сроки у разных индивидуумов и достоверные отличия %TDNA на 16 и 23 сутки между отдельными индивидуумами (рис. 7). Эти отличия между индивидуумами могут быть связаны с различиями в репарации сложных повреждений ДНК и отличиями метаболизма ДНК, ассоциированными с особенностями генома и эпигенетической регуляцией: аутбредные мыши SHK, как известно, отличаются большей генетической гетерогенностью [20]. Поскольку ускоренные ионы углерода имеют высокую относительную биологическую эффективность и низкий коэффициент кислородного усиления по сравнению с рентгеновскими лучами, то необходимо дальнейшее изучение биологических эффектов ^{12}C -облучения, связанных с участием АФК в отдаленные сроки после облучения в условиях *in vivo* [21].

Таким образом, выявлена вариация уровней повреждений ДНК лейкоцитов крови как в группах животных, так и у индивидуальных мышей в отдаленные сроки после облучения ионами углерода; при сравнении динамики изменений %TDNA при облучении ионами углерода с таковой при воздействии рентгеновского излучения у индивидуальных животных обнаружено, что и диапазон значений %TDNA, и их вариабельность наиболее явно выражены при облучении ионами углерода, что свидетельствует о большей нестабильности генома после воздействия ионов. Значение уровня повреждений ДНК в клетках крови лабораторных животных в формировании отдаленных последствий на организменном уровне требует дальнейшего исследования для разработки новых и совершенствования традиционных тест-систем с использованием моделей животных в свете развития как персонализированной биомедицины, так и применения их для доклинического исследования источников ядерной медицины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ «Курчатовский институт» В.А. Пикалову за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70 и сотруднику лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН С.И. Заичкиной за инициирование данного исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных. План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике (протокол № 4/2018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. Mohamad, B. J. Sishc, J. Saha, et al., *Cancers*, **9**, 66 (2017). DOI: 10.3390/cancers9060066
2. M. Moreno-Villanueva, M. Wong, T. Lu, et al., *npj Microgravity*, **3**, 14 (2017). DOI: 10.1038/s41526-017-0019-7
3. I. Vavitsas and K. Kalachani, *AIP Conf. Proc.*, **2075**, 200018 (2019). DOI: 10.1063/1.5099028
4. S. Muralidharan, S. P. Sasi, M. A. Zuriaga, et al., *Front. Oncol.*, **5**, 231 (2015). DOI: 10.3389/fonc.2015.00231
5. E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett.*, **327**, 48 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
6. A. R. Collins, A. A. Osoz, G. Brunborg, et al., *Mutagenesis*, **23** (3), 143 (2008).
7. E. A. Kuznetsova, N. P. Sirota, I. Y. Mitroshina, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **96** (10), 1245 (2020). DOI: 10.1080/09553002.2020.1807640
8. E. A. Kuznetsova, A. R. Dyukina, I. A. Chernigina, et al., *Bull. Eksperim. Biologii i Meditsiny*, **155** (6), 757 (2013). DOI: 10.1007/s10517-013-2245-7
9. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.*, **558**, 27 (2004).
10. D. P. Lovell and T. Omori, *Mutagenesis*, **23** (3), 171 (2008).
11. K. Datta, S. Suman, B. V. Kallakury, et al., *PLoS One*, **7** (8), e42224 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0042224
12. А. И. Газиев, *Радиационная биология. Радиоэкология*, **39** (6), 630 (1999).
13. M. H. Lankinen, L. M. Vilpo, and J. A. Vilpo, *Mutat. Res.*, **352** (1–2), 31 (1996).
14. J. M. Danforth, L. Provencher, and A. A. Goodarzi, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 910440 (2022). DOI: 10.3389/fcell.2022.910440
15. S. Kobashigawa, K. Suzuki, and S. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 795 (2011).
16. K. I. Matsumoto and M. Ueno, Y. Shoji et al., *Free Radic. Res.*, **55** (4), 450 (2021). DOI: 10.1080/10715762.2021.1899171
17. D. Averbek and C. Rodriguez-Lafrasse, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 11047 (2021). DOI: 10.3390/ijms222011047.
18. R. B. Richardson and M. E. Harper, *Oncotarget*, **7** (16), 21469 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.7412
19. N. Chatterjee and G. C. Walker, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58** (5), 235 (2017). DOI:10.1002/em.22087
20. <http://www.andreevka.msk.ru/product.htm>
21. W. Tinganelli and M. Durante, *Cancers (Basel)*, **12** (10), 3022 (2020). DOI: 10.3390/cancers12103022

Comparison of the Dynamics of DNA Damage in Blood Leukocytes and Survival of Mice after Total Body Irradiation with Bragg Peak Carbon Ions or X-Rays

**Е.А. Kuznetsova*, О.М. Rozanova*, Е.Н. Smirnova*, S.I. Glukhov*, T.V. Sirota*,
T.A. Belyakova** and N.P. Sirota ***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
Akademicheskii proezd 2/110, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

This study has determined a survival rate of mice irradiated with accelerated carbon ions (450 MeV/nucleon) in the Bragg peak or X-ray at a dose of 6.5 Gy, using the comet assay. Levels of DNA damage (%TDNA) in blood leukocytes from mice were measured 1 day before, 1–23 days after exposure to carbon ions and 1–28 days after exposure to X-ray radiation at the same dose. According to survival and % TDNA parameters, it was found that a damaging effect of carbon ions is greater than that of X-rays and substantial variations in % TDNA, which occur in individual animals, could appear to cause individual differences in the development of genome instability in the long term. It is assumed that a higher % TDNA in leukocytes after carbon ion exposure compared to that of X-rays, a wide range of variations and asynchronous changes in individuals in the post-irradiation period are associated with the induction of clustered DNA damages and mitochondrial dysfunction, and are also due to genetic and epigenetic factors. The results obtained point to the need to assess the state of blood leukocytes in animals with a heterogeneous genetic background using the comet assay before irradiation in order to form a group with similar %TDNA values. The revealed differences in individual laboratory animals require further study in order to improve animal models in the light of the development of personalized biomedicine.

Keywords: comet assay, X-ray irradiation, accelerated carbon ions, DNA damage in leukocytes, individual animals