

СНИЖЕНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ, РЕГИСТРИРУЕМЫХ В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРЕФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ, В РЕЗУЛЬТАТЕ ИХ КОНТАКТА С НЕОБЛУЧЕННЫМИ ЖИВОТНЫМИ

© 2024 г. И. Н. Когарко¹, В. В. Петушкива^{1, *}, Б. С. Когарко¹,
О. В. Ктиторова¹, Е. А. Нейфах¹, И. И. Ганеев¹, Н. С. Кузьмина^{1,2}

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

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

*E-mail: vladapetushkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.04.2024 г.

После доработки 21.05.2024 г.

Принята к публикации 29.05.2024 г.

Показаны противоположно направленные эффекты, заключающиеся в изменении поврежденности генома клеток организма облученных и необлученных особей в результате их взаимного контакта (передача «сигналов» взаимодействия). Снижение радиационно-индуцированных изменений в облученных клетках при контакте с необлученными клетками-«свидетелями» определено как «эффект спасения». В настоящем исследовании были использованы совместно содержащиеся облученные и необлученные мыши, которые были облучены в дозе 3 Гр. С помощью микроядерного теста оценивали частоту полихроматофильных эритроцитов (НХЭ) с микроядрами (МЯ), нормальных хроматофильных эритроцитов (НХЭ) микроядрами, суммарное количество эритроцитов на 3-е, 7-е, 14-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки после облучения. Было выявлено у облученных животных статистически значимое снижение частоты (НХЭ) эритроцитов с МЯ по сравнению с γ -контролем t_2 : на 3-е сутки после начала эксперимента при содержании в одной клетке без перегородки ($t_2 = 2.35$; $p = 0.03$); на 14-е сутки как в группе, где животные содержались без перегородки ($t_2 = 6.03$; $p = 0.000011$), так и в группе с перегородкой ($t_2 = 3.29$; $p = 0.004$); на 60-сутки в группе животных, содержащихся без перегородки ($t_2 = 2.8$; $p = 0.01$). Полученный результат может свидетельствовать, что контакт между облученными и необлученными мышами приводит к снижению числа поврежденных клеток у облученного животного, что может быть обозначено как «эффект спасения». У необлученных мышей-«свидетелей», содержащихся с облученными мышами в клетке с перегородкой, на 14-е сутки выявлена тенденция к превышению частоты микроядерных нормохроматофильных эритроцитов показателей в биоконтроле ($t_1 = 1.79$; $p = 0.9$); на 60-е сутки у необлученных мышей-«свидетелей», содержащихся с облученными мышами в клетке без перегородки, также выявлена тенденция к превышению частоты микроядерных эритроцитов показателей в биоконтроле ($t_1 = 1.39$; $p = 0.18$). На основании полученных в настоящей работе данных предполагается, что обнаруженный «эффект спасения» может быть применен как тест снижения уровня повреждающего действия радиации и пострадиационного восстановления клеток.

Ключевые слова: радиационно-индуцированный «эффект спасения»; микроядерный тест; эритроциты; пострадиационное восстановление клеток

DOI: 10.31857/S0869803124060059, EDN: NDHZAЕ

В настоящее время ведутся многочисленные исследования по разработке различного рода моделей (математических, медико-биологических, генетических и др.) с целью количественной и качественной оценки радиобиологических эффектов на клеточном и молекулярном уровнях [1]. Такое направление работ является важным инструментом для объяснения законо-

мерностей реализации последствий радиационного воздействия и создания тест-систем для своевременного их выявления в организме облученного человека. Анализ отдаленных «немишенных эффектов» воздействия ионизирующих излучений, в том числе «эффекта свидетеля» и «эффекта спасения» — отдельное направление исследований.

Если говорить об экспериментальных работах на культурах клеток *in vitro*, радиационно-индуцированный “эффект свидетеля” – это явление, при котором необлученные “свидетели”, находящиеся в непосредственном контакте с облученными клетками или в той среде, в которой содержались экспонированные клетки, демонстрируют такие же реакции, как если бы они сами подверглись воздействию радиации [2]. Радиационно-индуцированный “эффект спасения” – феномен, проявляющийся в снижении выраженности негативных эффектов в облученных клетках в результате контакта с неэкспонированными “свидетелями” или со средой, в которой ранее культивировали клетки, не подвергшиеся радиационному воздействию [3].

Впервые “эффект спасения” был обнаружен в 2011 г. при культивировании нормальных клеток – фибробластов легких человека и опухолевых клеток (клетки рака шейки матки человека) [4]. Радиационно-индуцированный “эффект спасения” был определен как снижение выраженности негативных эффектов отрицательного воздействия в облученных клетках при наличии контакта с неэкспонированными клетками-“свидетелями”. Было показано изменение уровня экспрессии p-53 связывающего белка и микроядер, а также уменьшение числа апоптотических клеток.

Цель настоящей работы заключалась в выявлении “эффекта спасения” на модели эритроцитов ПК мышей, подвергшихся воздействию γ -излучения и содержавшихся совместно с необлученными животными-“свидетелями”. Демонстрация данного феномена как модели регистрации уменьшения выраженности негативных эффектов радиации на клетках различных видов применима для идентификации степени пострадиационного восстановления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы 60 беспородных мышей-самок. Исследование проводили на белых беспородных мышах, сток CD1 (ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России) в возрасте 2,5 мес., массой 23–26 г к началу эксперимента. Данные животные были здоровы и содержались в экспериментальных условиях, соответствующих международным нормам [5, 6]. Грызуны ($n = 20$) подверглись облучению в дозе 3 Гр на исследовательской радиобиологической гамма-установке ИГУР-1М с 4 источниками ^{137}Cs , мощность дозы 0,79 Гр/мин, неравномерность γ - поля в рабочем

пространстве не более 5%. Поглощенная доза для мышей составила 3,0 Гр.

Были взяты четыре клетки, в которые помещались экспериментальные животные. В каждой находилось по пять облученных и пять необлученных мышей (мыши-“свидетели”). В двух из четырех клеток экспонированные и необлученные мыши могли свободно контактировать друг с другом. В двух других клетках облученные и необлученные животные были разделены металлической сеткой, что исключало их тактильный контакт. В качестве групп сравнения были взяты необлученные мыши (группа биоконтроля, $n = 10$) и облученные животные (группа облученного контроля, $n = 10$), каждая из которых содержалась в отдельной клетке. Получено шесть экспериментальных групп, продолжительность эксперимента составила 3 мес.

Применили метод подсчета изменения частоты микроядерных (МЯ) эритроцитов, который является способом оценки генотоксического действия различных факторов, а именно, выявления нарушений, ассоциированных с нестабильностью генома, а также других клеточных патологических процессов, связанных с повреждением ДНК, хроматина и нарушением деления клеток [7].

Кровь из хвостовой вены мышей отбирали на 3-и, 7-, 14-, 30-, 60-, 90-е сутки после начала эксперимента. Готовили мазки крови для определения частоты эритроцитов с микроядрами, а также клеточного состава периферической крови. Мазки фиксировали метанолом в течение 3 мин, высушивали, окрашивали по Романовскому-Гимзе. Препараты для анализа кодировали. Кодированные препараты анализировали с помощью микроскопов Axio Scop. A1 и Axio Image. M2 (Ziess). Максимальный разовый объем кровопотери для каждого животного не превышал 3% от объема циркулирующей крови (для мышей данной возрастной группы). С целью определения частоты эритроцитов с микроядрами анализировали 1000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) и не менее 2000 нормальных (оксифильных) эритроцитов (НХЭ).

Статистический анализ проводили двумя методами: с помощью *t*-критерия Стьюдента и многофакторного дисперсионного анализа признаков сопряженности с применением обобщенной линейной модели. С помощью *t*-критерия Стьюдента различия принимали статистически значимыми при вероятности 0-гипотезы

$p < 0.05$. Для сравнительного анализа полученных данных выделили следующие воздействующие факторы: γ -излучение; срок после начала эксперимента; “фактор контакта” — вид контакта между облученным и необлученным животным (0 — отсутствие контакта между облученными и необлученными животными; 1 — обонятельный контакт (с перегородкой); 2 — тактильный и обонятельный контакт (без перегородки).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе производили оценку частоты ПХЭ с микроядрами (табл. 1), нормальных НХЭ эритроцитов с микроядрами (табл. 2), суммарного количества эритроцитов (табл. 3) в периферической крови у мышей через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 суток после начала эксперимента.

В группе биологического контроля средняя частота ПХЭ с микроядрами в периферической крови мышей составляла 0.2–0.6 %. Начиная с 7-х суток после воздействия γ -излучения у животных происходило статистически значимое ($t = 2.95$; $p = 0.01$) увеличение частоты ПХЭ с микроядрами, когда этот показатель превышал значение в группе биологического контроля почти в 5 раз. Такой высокий уровень цитогенетических повреждений сохранялся до 14 суток, а далее происходило снижение частоты рассматриваемых хромосомных нарушений (рис. 1).

В группах необлученных животных-“свидетелей” статистически значимые изменения ча-

стот ПХЭ с микроядрами не выявлены. Однако, отметим, что на 7-е сутки у этих неэкспонированных мышей, содержащихся с облученными грызунами в клетке с перегородкой, выявлена тенденция к повышению уровня микроядерных эритроцитов ($t_1 = 0.88$; $p = 0.39$). При этом, у облученных животных, контактировавших с необлученными мышами — “свидетелями” (клетка с перегородкой) на 14-е сутки после начала эксперимента зарегистрировано статистически значимое ($t = 2.32$; $p = 0.03$) снижение частоты ПХЭ с микроядрами по сравнению со значением показателя в группе γ -контроля (рис. 2). Предполагается, что данный результат является “эффектом спасения” для ПХЭ с микроядрами.

При анализе частоты НХЭ с микроядрами в группе биологического контроля было выявлено, что этот показатель в начале эксперимента составлял $1.09 \pm 0.18 \%$. В дальнейшем происходило его снижение, и на 90-е сутки частота НХЭ с микроядрами была равна $0.26 \pm 0.12 \%$. Исследования на протяжении всего эксперимента показали, что воздействие γ -излучения в дозе 3 Гр приводило к статистически значимому повышению частоты цитогенетических нарушений. Так на 14-е сутки после начала эксперимента рассматриваемый показатель в 3.7 раза превышал таковой в группе биологического контроля. В последующем, начиная с 30-х суток, в группе γ -контроля частота НХЭ эритроцитов с микроядрами существенно не менялась, составляла около 1%, превышая соответствующие значения в группе биологического контроля в 2–3 раза (рис. 3).

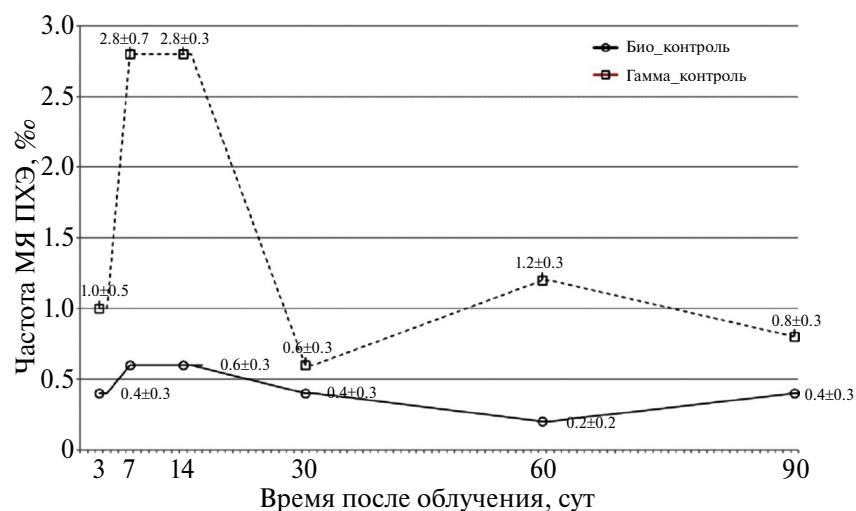


Рис. 1. Изменение частоты микроядерных полихроматофильных эритроцитов в ПК мышей под действием γ -облучения. Сравнение биоконтроля и облученного контроля.

Fig. 1. Change in the frequency of micronucleated polychromatophilic erythrocytes in peripheral blood of mouse under the influence of γ irradiation. Comparison of biological control and irradiated control.

Таблица 1. Частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных в различные сроки после начала эксперимента, %^{oo}

Table 1. Frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals at different times after the beginning of the experiment, %^{oo}

Время после начала эксперимента, сут	Биологический контроль	Необлученные свидетели (перегородка)	Необлученные свидетели (перегородка)	Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями (перегородка)	
				Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями (перегородка)	Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями (перегородка)
3	0.4 ± 0.27	0.2 ± 0.2	0	1 ± 0.45	0.6 ± 0.31
		$t_1 = 0.6; p = 0.56$	$t_1 = 1.5; p = 0.15$	$t_1 = 1.15; p = 0.265$	$t_1 = 0.49; p = 0.63$
				$t_2 = 0.74; p = 0.47$	$t_1 = 0.4; p = 0.69$
7	0.6 ± 0.31	0.4 ± 0.27	1 ± 0.33	2.8 ± 0.68	$t_2 = 0.65; p = 0.52$
					$t_2 = 0.52$
					2 ± 0.52
14	0.6 ± 0.31	0	0.2 ± 0.2	2.8 ± 0.33	$t_1 = 2.33; p = 0.03$
					$t_1 = 2.33; p = 0.03$
					$t_2 = 0.94; p = 0.36$
					$t_2 = 0.94; p = 0.36$
30	0.4 ± 0.27	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.31	$t_1 = 4.92; p = 0.00011$
					$t_1 = 4.92; p = 0.00011$
					$t_1 = 2.15; p = 0.05$
					$t_1 = 2.15; p = 0.05$
60	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.27	0.4 ± 0.27	1.2 ± 0.33	$t_1 = 1.76; p = 0.1$
					$t_1 = 1.76; p = 0.1$
					$t_2 = 2.32; p = 0.03$
					$t_2 = 2.32; p = 0.03$
90	0.4 ± 0.27	0.6 ± 0.31	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.33	$t_1 = 1.39; p = 0.18$
					$t_1 = 1.39; p = 0.18$
					$t_2 = 2.06; p = 0.05$
					$t_2 = 2.06; p = 0.05$
					$t_2 = 0; p = 1$
					$t_2 = 0; p = 1$

Примечание. t_1 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении с показателем в группе биологического контроля; t_2 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении со значением показателя в группе γ -контроля; p — уровень значимости.

*Статистически значимые результаты.

Таблица 2. Частота нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных в различные сроки после начала эксперимента, %

Table 2. Frequency of normochromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals at different times after the start of the experiment. %

СНИЖЕНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ

Время после начала эксперимента, сут	Биологический контроль	Необлученные свидетели		γ-Контроль	Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями	Облученные в одной клетке (перегородка) с необлученными свидетелями (перегородка)
		Необлученные свидетели (перегородка)	Необлученные свидетели			
3	1.09 ± 0.18	1 ± 0.24	1.2 ± 0.14	2.01 ± 0.23	1.21 ± 0.25*	2.12 ± 0.31
		$t_1 = 0.3; p = 0.77$	$t_1 = 0.46; p = 0.65$	$t_1 = 3.17; p = 0.005$	$t_1 = 0.39; p = 0.701$	$t_1 = 2.89; p = 0.01$
				$t_2 = 2.35; p = 0.03$	$t_2 = 2.35; p = 0.03$	$t_2 = 0.28; p = 0.78$
7	1.17 ± 0.11	1.34 ± 0.17	1.62 ± 0.24	2.71 ± 0.35	2.93 ± 0.52	2.22 ± 0.3
		$t_1 = 0.86; p = 0.4$	$t_1 = 1.71; p = 0.1$	$t_1 = 4.22; p = 0.00051$	$t_1 = 3.27; p = 0.0043$	$t_1 = 3.29; p = 0.0041$
				$t_2 = 0.34; p = 0.74$	$t_2 = 0.34; p = 0.74$	$t_2 = 1.08; p = 0.29$
14	0.64 ± 0.11	0.63 ± 0.21	1.02 ± 0.19	2.37 ± 0.22	0.9 ± 0.11*	1.47 ± 0.16*
		$t_1 = 0.04; p = 0.97$	$t_1 = 1.79; p = 0.09$	$t_1 = 7.16; p = 0.0000011$	$t_1 = 1.72; p = 0.1$	$t_1 = 4.28; p = 0.0005$
				$t_2 = 6.03; p = 0.000011$	$t_2 = 6.03; p = 0.000011$	$t_2 = 3.29; p = 0.004$
30	0.58 ± 0.1	0.36 ± 0.13	0.51 ± 0.11	0.95 ± 0.13	1.2 ± 0.14	1.55 ± 0.19
		$t_1 = 1.35; p = 0.19$	$t_1 = 0.49; p = 0.63$	$t_1 = 2.25; p = 0.037$	$t_1 = 3.69; p = 0.002$	$t_1 = 4.54; p = 0.0003$
				$t_2 = 1.3; p = 0.21$	$t_2 = 1.3; p = 0.21$	$t_2 = 2.59; p = 0.02$
60	0.37 ± 0.14	0.75 ± 0.23	0.1 ± 0.07	1.05 ± 0.13	0.52 ± 0.14*	1.42 ± 0.24
		$t_1 = 1.39; p = 0.18$	$t_1 = 1.75; p = 0.1$	$t_1 = 3.5; p = 0.003$	$t_1 = 0.75; p = 0.46$	$t_1 = 3.77; p = 0.001$
				$t_2 = 2.8; p = 0.01$	$t_2 = 2.8; p = 0.01$	$t_2 = 1.32; p = 0.2$
90	0.26 ± 0.12	0.26 ± 0.12	0.82 ± 0.26	1.31 ± 0.18	0.82 ± 0.17	1.14 ± 0.23
		$t_1 = 0.02; p = 0.98$	$t_1 = 1.99; p = 0.06$	$t_1 = 4.92; p = 0.0001$	$t_1 = 2.65; p = 0.02$	$t_1 = 3.4; p = 0.0032$
				$t_2 = 1.97; p = 0.06$	$t_2 = 1.97; p = 0.06$	$t_2 = 0.58; p = 0.57$

Примечание. t_1 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении с показателем в группе биологического контроля; t_2 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении

* Статистически значимые результаты со значением показателя в группе γ-кон

Таблица 3. Частота эритроцитов с микроядрами в ПК экспериментальных животных в различные сроки после начала эксперимента, %
Table 3. Frequency of erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals at different times after the start of the experiment, %

Время после начала эксперимента, сут	Биологический контроль	Необлученные свидетели (перегородка)	Необлученные свидетели (перегородка)	γ -Контроль	Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями	Облученные в одной клетке с необлученными свидетелями (перегородка)
3	0.95 ± 0.15	0.83 ± 0.2	0.95 ± 0.11	1.8 ± 0.17	1.09 ± 0.2*	1.81 ± 0.25
		$t_1 = 0.47; p = 0.64$	$t_1 = 0.01; p = 0.99$	$t_1 = 3.8; p = 0.001$	$t_1 = 0.56; p = 0.582$	$t_1 = 2.92; p = 0.01$
					$t_2 = 2.75; p = 0.01$	$t_2 = 0.04; p = 0.97$
7	1.05 ± 0.09	1.14 ± 0.16	1.49 ± 0.21	2.74 ± 0.34	2.74 ± 0.48	2.17 ± 0.29
		$t_1 = 0.5; p = 0.62$	$t_1 = 1.93; p = 0.07$	$t_1 = 4.74; p = 0.00016$	$t_1 = 3.47; p = 0.0027$	$t_1 = 3.62; p = 0.002$
					$t_2 = 0; p = 1$	$t_2 = 1.25; p = 0.23$
14	0.63 ± 0.09	0.5 ± 0.16	0.85 ± 0.14	2.47 ± 0.21	1.09 ± 0.11*	1.5 ± 0.16*
		$t_1 = 0.7; p = 0.49$	$t_1 = 1.29; p = 0.21$	$t_1 = 8.16; p = 0.0000002$	$t_1 = 3.19; p = 0.01$	$t_1 = 4.71; p = 0.0002$
					$t_2 = 5.94; p = 0.000013$	$t_2 = 3.73; p = 0.002$
30	0.54 ± 0.06	0.33 ± 0.13	0.45 ± 0.11	0.88 ± 0.13	1.16 ± 0.14	1.4 ± 0.16
		$t_1 = 1.46; p = 0.16$	$t_1 = 0.74; p = 0.47$	$t_1 = 2.28; p = 0.035$	$t_1 = 4.08; p = 0.001$	$t_1 = 4.83; p = 0.0001$
					$t_2 = 1.48; p = 0.16$	$t_2 = 2.47; p = 0.02$
60	0.34 ± 0.14	0.67 ± 0.18	0.16 ± 0.07	1.09 ± 0.11	0.62 ± 0.18*	1.37 ± 0.21
		$t_1 = 1.47; p = 0.16$	$t_1 = 1.13; p = 0.27$	$t_1 = 4.21; p = 0.001$	$t_1 = 1.24; p = 0.23$	$t_1 = 4.13; p = 0.001$
					$t_2 = 2.24; p = 0.04$	$t_2 = 1.22; p = 0.24$
90	0.29 ± 0.09	0.33 ± 0.08	0.69 ± 0.23	1.2 ± 0.14	0.9 ± 0.17	1.03 ± 0.22
		$t_1 = 0.31; p = 0.76$	$t_1 = 1.64; p = 0.12$	$t_1 = 5.4; p = 0.00004$	$t_1 = 3.16; p = 0.01$	$t_1 = 3.06; p = 0.0067$
					$t_2 = 1.37; p = 0.19$	$t_2 = 0.65; p = 0.52$

Примечание. t_1 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении с показателем в группе биологического контроля; t_2 — значение t -критерия Стьюдента при сравнении со значением показателя в группе γ -контроля; p — уровень значимости.

* Статистически значимые результаты.

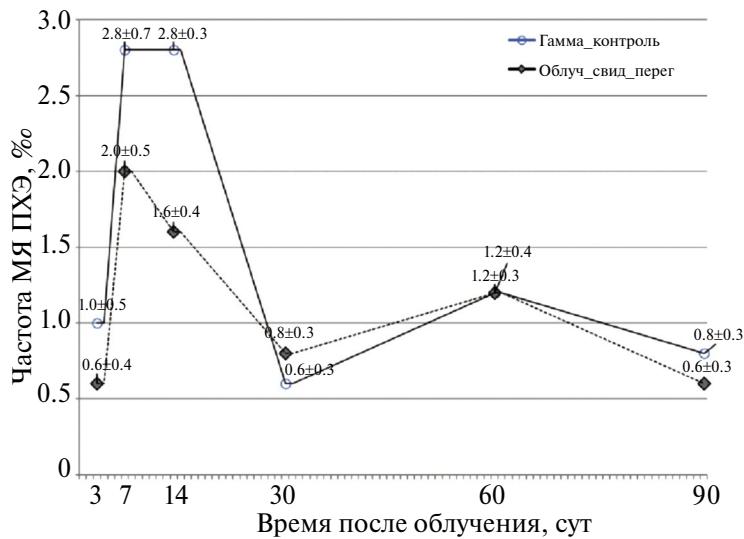


Рис. 2. Изменение частоты полихроматофильных эритроцитов в ПК облученных мышей под влиянием фактора контакта. Сравнение группы облученных мышей, контактировавших с мышами-“свидетелями” через перегородку и облученного контроля.

Fig. 2. Change in the frequency of micronucleated polychromatophilic erythrocytes in the PB of irradiated mice under the influence of the contact factor. Comparison of the group of irradiated mice caged in contact with “bystander” mice in cages with the septum and the irradiated control.

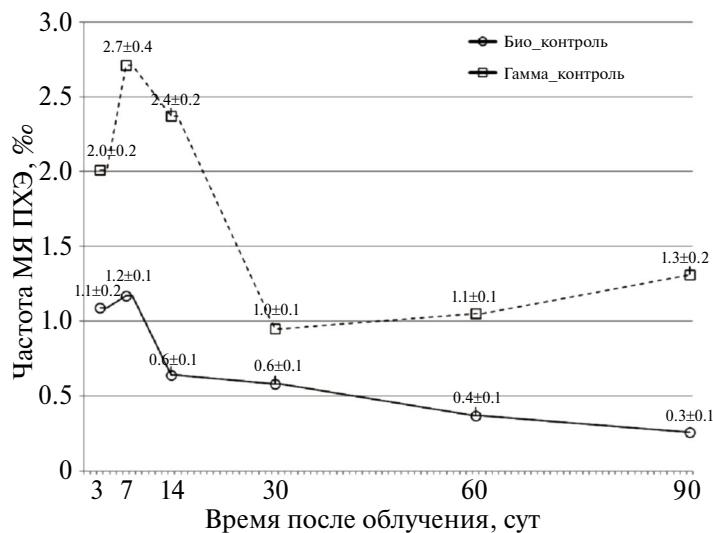


Рис. 3. Изменение частоты нормальных хроматофильных эритроцитов в ПК мышей под действием γ -облучения. Сравнение биоконтроля и облученного контроля.

Fig. 3. Change in the frequency of micronucleated normal chromatophilic erythrocytes in mouse PB under the influence of γ irradiation. Comparison of biological control and irradiated control.

У необлученных животных-“свидетелей” не выявлено статистически значимых изменений частоты НХЭ с микроядрами по сравнению с не-экспонированными мышами группы сравнения (биологический контроль). Как видно из рис. 4, результатом содержания облученных мышей с необлученными животными-“свидетелями” являлось статистически значимое снижение ча-

стоты НХЭ с микроядрами в организме, подвергшемся радиационному воздействию (сравнение с γ -контролем t_2 ; приведены также результаты сравнения с биоконтролем t_1 , где p — уровень значимости).

У облученных мышей, находившихся в контакте с неэкспонированными животными-

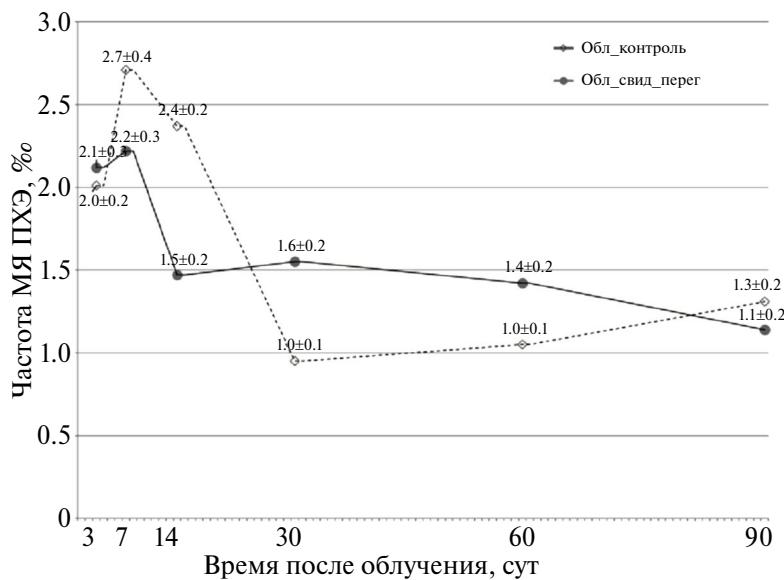


Рис. 4. Изменение частоты нормальных хроматофильных эритроцитов в ПК облученных мышей под влиянием фактора контакта. Сравнение группы облученных мышей, контактировавших с мышами-“свидетелями” через перегородку и облученного контроля.

Fig. 4. Change in the frequency of micronucleated normal chromatophilic erythrocytes in the PB of irradiated mice under the influence of the contact factor. Comparison of the group of irradiated mice caged together with “bystander” mice in cages through septum and the irradiated control.

“свидетелями”, отмечалось значимое снижение частоты НХЭ с микроядрами в следующие сроки: на 3-и сутки (клетка без перегородки; $t_1 = 0.39$; $p = 0.701$; $t_2 = 2.35$; $p = 0.03$), на 14-е сутки ($t_1 = 1.72$; $p = 0.1$; $t_2 = 6.03$; $p = 0.000011$ и $t_1 = 4.28$; $p = 0.0005$; $t_2 = 3.29$; $p = 0.004$ для клетки без перегородки и с перегородкой, соответственно), на 60-е сутки (клетка без перегородки; $t_1 = 0.75$; $p = 0.46$; $t_2 = 2.8$; $p = 0.01$) после начала эксперимента.

Результаты исследований, соответствующие частотам НХЭ с микроядрами в организме облученного животного на 3-и, 14-е и 60-е сутки после начала эксперимента, свидетельствуют об индуцированном “эффекте спасения” при контакте с необлученными особями.

В те же сроки, на 14-е и 60-е сутки после начала эксперимента, у необлученных мышей-“свидетелей”, содержавшихся с облученными животными в клетке с перегородкой, отмечается тенденция к повышению частоты микроядерных эритроцитов по сравнению с биоконтролем ($t_1 = 1.79$; $p = 0.09$ и $t_1 = 1.75$; $p = 0.1$ соответственно).

В то же время выявлено повышение частоты НХЭ с микроядрами в периферической кро-

ви у облученных животных, которых содержали в одной клетке с перегородкой с необлученными мышами-свидетелями (группа 2) на 30-е сутки после начала эксперимента (рис. 4).

При проведении многофакторного дисперсионного анализа в главной обобщенной модели было выявлено значимое влияние факторов “Облучение” ($F = 59.45$; $p = 1.3 \times 10^{-13}$) и “времени после начала эксперимента” ($F = 4.58$; $p = 0.033$) на частоту ПХЭ с микроядрами (табл. 4, табл. 5). При этом воздействие γ -излучения приводило к повышению частоты ПХЭ с микроядрами в среднем на 0.97 %, и показатель снижался на 0.0042 % в сутки. Показано и существенное влияние фактора “контакта” на рассматриваемый показатель (табл. 6, табл. 7).

Частота всех эритроцитов с микроядрами фактически представляет собой объединение данных для частоты ПХЭ и НХЭ с микроядрами, однако в связи с увеличением числа проанализированных эритроцитов в этом случае повышается статистическая сила анализа (табл. 8, табл. 9). При содержании облученных и необлученных мышей в одной клетке без перегородки у облученных мышей регистрируется снижение частоты эритроцитов с микроядрами в среднем на 0.43%.

Таблица 4. Влияние различных факторов на частоту полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных (многофакторный анализ с использованием обобщенной линейной модели)**Table 4.** Influence of various factors on the frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals (multivariate analysis using a generalized linear model)

Факторы	F	Значимость (p)
Облучение	59.45	1.3×10^{-13}
Фактор контакта	1.52	2.2×10^{-1}
День	4.58	3.3×10^{-2}
Облучение* Фактор контакта	0.49	6.1×10^{-1}

Примечание. $R^2 = 0.162$.

*Взаимодействие факторов.

Таблица 5. Параметры обобщенной линейной модели при анализе влияния различных факторов на частоту полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных**Table 5.** Parameters of the generalized linear model in the analysis of the influence of various factors on the frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals

Параметры	B	t	Значимость (p)
Свободный член	1.45	13.2	1.33×10^{-32}
[Облучение = 0]	0		
[Облучение = 1]	0.966	7.71	1.26×10^{-13}
День	-0.0042	-2.14	3.29×10^{-2}

Таблица 6. Влияние различных факторов на частоту нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных (многофакторный анализ с использованием обобщенной линейной модели)**Table 6.** Influence of various factors on the frequency of normochromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals (multivariate analysis using a generalized linear model)

Параметры	F	Значимость (p)
Фактор контакта	4.38	1.3×10^{-2}
День	73.51	3.2×10^{-16}
Облучение	97.74	1.7×10^{-20}
Облучение* Фактор контакта	3.42	3.4×10^{-2}

Примечание. $R^2 = 0.346$.

*Взаимодействие факторов.

Таблица 7. Параметры обобщенной линейной модели при анализе влияния различных факторов на частоту нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных

Table 7. Parameters of the generalized linear model in the analysis of the influence of various factors on the frequency of normochromatophilic erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals

Параметр	<i>B</i>	<i>t</i>	Значимость (<i>p</i>)
Свободный член	2.10	19.75	5.00×10^{-59}
[Фактор контакта = 0]	0	—	—
[Фактор контакта = 1]	-0.083	-0.60	5.47×10^{-1}
[Фактор контакта = 2]	-0.47	-3.43	6.75×10^{-4}
День	-0.01	-8.57	3.18×10^{-16}
[Облучение=00]	0		
[Облучение = 1,00]	1.05	7.60	2.61×10^{-13}
[Облучение=00] * [Фактор контакта = 1]	0.27	1.41	1.59×10^{-1}
[Облучение=00] * [Фактор контакта = 2]	0.509	2.61	9.36×10^{-3}
[Облучение=00] * [Фактор контакта = 0]	0	—	—
[Облучение = 1,00] * [Фактор контакта = 1]	0	—	—
[Облучение = 1,00] * [Фактор контакта = 2]	0	—	—
[Облучение = 1,00] * [Фактор контакта = 0]	0	—	—

Таблица 8. Влияние различных факторов на частоту эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных (многофакторный анализ с использованием обобщенной линейной модели)

Table 8. Influence of various factors on the frequency of erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals (multivariate analysis using a generalized linear model)

Параметры	<i>F</i>	Значимость (<i>p</i>)
Фактор контакта	3.80	2.3×10^{-2}
День	67.64	3.8×10^{-15}
Облучение	129.39	9.4×10^{-26}
Облучение* Фактор контакта	3.04	4.9×10^{-2}

Примечание. $R^2 = 0.374$.

*Взаимодействие факторов.

Таблица 9. Параметры обобщенной линейной модели при анализе влияния различных факторов на частоту эритроцитов с микроядрами в периферической крови экспериментальных животных

Table 9. Parameters of the generalized linear model in the analysis of the influence of various factors on the frequency of erythrocytes with micronucleus in the peripheral blood of experimental animals

Параметр	<i>B</i>	<i>t</i>	Значимость (<i>p</i>)
Свободный член	2.017	20.80	2.83×10^{-63}
[Фактор контакта = 0]	0.000	.	.
[Фактор контакта = 1]	-0.15	-1.18	2.37×10^{-1}
[Фактор контакта = 2]	-0.43	-3.44	6.59×10^{-4}
День	-0.009	-8.22	3.81×10^{-15}
[Облучение = .00]	0.000		
[Облучение = 1.00]	1.06	8.46	7.36×10^{-16}
[Облучение = .00]* [Фактор контакта = 0]	0.000	.	.
[Облучение = .00]* [Фактор контакта = 1]	0.28	1.58	1.1×10^{-1}
[Облучение = .00]* [Фактор контакта = 2]	0.43	2.43	1.57×10^{-2}
[Облучение = 1.00]* [Фактор контакта = 0]	0.000	-	-
[Облучение = 1.00]* [Фактор контакта = 1]	0.000	-	-
[Облучение = 1.00]* [Фактор контакта = 2]	0.000	-	-

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, показан радиационно-индущированный “эффект свидетеля” на НХЭ и ПХЭ эритроцитах с МЯ в ПК мышей, который проявлялся первоначальным повышением рассматриваемого показателя, а затем его снижением в зависимости от времени после начала эксперимента. Тактильный и обонятельный контакт приводил к уменьшению частоты НХЭ с МЯ у облученных мышей, которые содержались с необлученными животными-“свидетелями”. Полученные результаты предполагают наличие “эффекта спасения”. В те же сроки отмечалась тенденция к повышению частоты МЯ НХЭ эритроцитов у необлученных мышей-“свидетелей”, находившихся в контакте с особями, подвергшимися радиационному воздействию.

По данным литературы [8] воздействие любого типа ИИ вызывает различные поврежде-

ния ДНК, включая однонитевые и двунитевые разрывы, окисление или потерю оснований, что в первую очередь связано с генерацией электронов, которые при взаимодействии с водой производят свободные радикалы. Свободные радикалы атакуют ДНК, белки и липиды. При этом идет высвобождение химических и биологических медиаторов из области облучения, что таким образом обеспечивает передачу радиационного воздействия через так называемые “сигналы опасности”.

По мнению других авторов [9], цепочка последовательных событий в сигнальной системе возникновения “эффекта спасения” и “эффекта свидетеля” состоит из: первично-го окислительного стресса → модификации ДНК → апоптоза поврежденных клеток → свободной модифицированной вн-ДНК → сигнала необлученным клеткам → вторичного окислительного стресса т. д. В других статьях, посвящен-

ных этим феноменам, в частности Nikitaki и соавт. [8] утверждают, что повреждения ДНК, пути reparации разрывов ДНК, создание сети белкового взаимодействия, сигнальные пути апоптоза, Nod-подобные рецепторы являются основными путями, участвующими в реализации “эффектов спасения” и “эффектов свидетеля”.

Особое значение для понимания механизмов образования и передачи химических мессенджеров при возникновении “эффектов спасения” и “эффектов свидетеля” имеет исследование сигнального пути циклического адениазинмонофосфата. Лам и соавт. [10,11] показали его активацию в облученных клетках и участие в функционировании ядерного фактора NF-кВ в облученных клетках. Кроме того, было обнаружено, что оксид азота (NO) способен стимулировать активность ядерного фактора NF-кВ, отсюда запускаются механизмы, лежащие в основе радиационно-индуцированных, NO-опосредованных эффектов, которые могут участвовать в реализации “эффекта спасения” и “эффекта свидетеля”.

В работах [12] показано, что “эффект спасения” возможен при культивировании облученных макрофагов человека с необлученными гепатоцитами (клетками-“свидетелями”). При этом наблюдается радиационно-индуцированное уменьшение cAMP в облученных клетках и освобождение cAMP из клеток-“свидетелей”. Авторы предположили, что “эффект спасения” был опосредован cAMP (белок-рецептор cAMP), который передается от клеток-“свидетелей” к облученным клеткам.

Суммируя представленные в работе данные по изучению индуцированного “эффекта спасения” на НХЭ и ПХЭ облученных мышей, которые контактировали с необлученными животными-свидетелями, а также результаты других исследований [2], можно представить “эффект спасения” как один из показателей оценки степени восстановления облученных клеток тканей, органов.

Следовательно, раскрытие механизмов, лежащих в основе “эффекта спасения”, позволит разрабатывать альтернативные лечебные процедуры или лекарственные средства при применении лучевой терапии. Возможен прием медикаментозных препаратов перед сеансами радиотерапии с целью усиления повреждаемости клеток опухолевого очага и минимизации негативного воздействия на здоровые ткани.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России, за счет субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания, тема: “Фундаментальные физико-химические исследования механизмов физиологических процессов и создание на их основе фармакологических веществ и лекарственных форм для лечения и профилактики социально значимых заболеваний”, № 122040400089-6. Часть исследования выполнена в рамках темы государственного задания Минобрнауки России “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека” (№ 122022600163-7), подтема “Генотоксики и антигеноксики окружающей среды: маркеры отдаленного воздействия и генетические риски развития широко распространенных заболеваний”.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported within frameworks of the state assignment for N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences “Fundamental physical and chemical studies of the mechanisms of physiological processes and the creation of pharmacological substances and dosage forms for the treatment and prevention of socially significant diseases on their basis” (state registration № 122040400089-6). Part of the study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation “Mechanisms of genetic processes in microorganisms, plants, animals and humans” (No 122022600163-7), subsection “Genotoxins and environmental antigenoxinants: markers of long-term exposure and genetic risks of developing widespread diseases”.

“Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи” (“The authors declare no conflicts of interests”)

“Вклад авторов: все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации” (“Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang F.R., Loke W.K. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander

- effects, and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015;91(1):13–27.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2014.937510>
2. Yu K.N. Radiation-induced rescue effect. *J. Radiat. Res.* 2019;60(2):163–170.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rty109>
3. Когарко И. Н., Петушкива В. В., Когарко Б. С. и др. Исследование действия ионизирующего излучения на радиационно-индуцируемые изменения клеток системы кровимышей на уровне организма. *Радиация и Риск.* 2023;32(1):48–60. [Kogarko I. N., Petushkova V. V., Kogarko B. S., et al. Investigation of the effects of ionizing radiation on radiation-induced bystander changes in the cells of the blood system of mice at the inter-organism level. *Radiation and Risk.* 2023;32(1):48–60. (In Russ.)]
<http://doi.org/10.21870/0131-3878-2023-32-1-48-60>
4. Chen S., Zhao Y., Han W. et al. Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through intercellular signal feedback. *Mutat. Res.* 2011;706(1-2):59–64.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.10.011>
5. 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.
6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes ETS No. 123, Appendix A.
<https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>
7. Hayashi M. *Genes Environ.* 2016 Oct 1; 38:18. eCollection 2016.
<https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>
8. Nikitaki Z., Mavragani I.V., Laskaratos D.A. et al. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new ‘old’ paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin. Cancer Biol.* 2016; 37-38:77–95.
<https://doi.org/10.1016/j.semancer.2016.02.002>. Epub 2016 Feb 9
9. Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В. и др. ДНК-сигнальный путь, обеспечивающий развитие радиационного эффекта свидетеля в клетках человека. *Радиац. биология. Радиоэкология.* 2011;51(6): 651–659. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., et al. DNA Signaling Pathway Mediating Development of a Radiation Induced Bystander Effect in Human Cells. *Radiation biology. Radioecology.* 2011; 51 (6): 651–659. (In Russ.)
10. Lam R.K.K., Fung YK, Han W et al. Modulation of NF-κB in rescued irradiated cells. *Radiat. Prot. Dosim.* 2015;167(1-3): 37–43.
<https://doi.org/10.1093/rpd/ncv217>
11. Lam R.K.K., Han W., Yu K.N. Unirradiated cells rescue cells exposed to ionizing radiation: activation of NF-κB pathway in irradiated cells. *Mutat. Res.* 2015; (782): 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.10.004>
12. He M., Dong C., Xie Y. et al. Reciprocal bystander effect between α -irradiated macrophage and hepatocyte is mediated by cAMP through a membrane-signaling pathway. *Mutat. Res.* 2014;(763–764):1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.001>

Reduction of Radiation-Induced Effects Recorded in Peripheral Blood Erythrocytes of Irradiated Mice as a Result of Their Contact with Non-Irradiated Animals

I. N. Kogarko¹, V. V. Petushkova^{1, *}, B. S. Kogarko¹, O. V. Ktitorova¹, E. A. Neyfakh¹,
 I. I. Ganeev¹, N. S. Kuzmina^{1,2}

¹N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*E-mail: vladapetushkova@yandex.ru

In this work, it is shown that irradiated polychromatophilic and normal chromatophilic peripheral blood erythrocytes of mice are able to transmit extracellular signals to non-irradiated “bystander” cells when animals are kept together. A decrease in radiation-induced changes in irradiated cells upon contact with unirradiated “bystander” cells is defined as a “rescue effect”. The experiment used jointly kept non-irradiated and irradiated mice that were exposed at a dose of 3 Gy on a research radiobiological gamma facility with 4 sources of ^{137}Cs . The frequency of polychromatophilic erythrocytes with micronucleus, normal chromatophilic erythrocytes with micronucleus, the total number of erythrocytes with these genome damages in peripheral blood on the 3rd, 7th, 14th, 30th, 60th and 90th days after irradiation was assessed using the micronucleus test. Statistical analysis was carried out using the Student’s t-test. A statistically significant decrease in the frequency of erythrocytes with micronucleus was found in irradiated animals compared to t_2 (gamma control): on the 3rd day after the start of the experiment when kept in one cage without a septum ($t_2 = 2.35$; $p = 0.03$); on the 14th day as in the group where the animals were kept without a septum ($t_2 = 6.03$; $p = 0.000011$), and in a group with a partition ($t_2 = 3.29$; $p = 0.004$); on the 60-th day in the group of animals kept without a septum ($t_2 = 2.8$;

$p = 0.01$). The result may indicate that contact between irradiated and non-irradiated mice leads to a decrease in the number of damaged cells in the irradiated animal, which can be referred to as the “rescue effect”. On day 14, non-irradiated “bystander” mice kept with irradiated mice in a septal cage showed a tendency to exceed the frequency of micronucleated erythrocyte indicators in biocontrol ($t_1 = 1.79; p = 0.9$); on the 60th day, in non-irradiated “bystander” mice kept with irradiated mice in a cell without a septum, there was also a tendency to exceed the frequency of micronucleated erythrocyte indicators in biocontrol ($t_1 = 1.39; p = 0.18$). Based on the data obtained in this work, it is assumed that the discovered “rescue effect” can be used as a test for reducing the level of the damaging effect of radiation and post-radiation cell recovery.

Keywords: radiation-induced “rescue effect”; micronucleus test; erythrocytes; post-radiation cell recovery

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Когарко Иветта Николаевна (Kogarko Ivetta Nikolaevna), <https://orcid.org/0000-0002-5065-6249>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: bkogarko@yahoo.com

Петушкова Влада Валерьевна (Petushkova Vlada Valerevna), <https://orcid.org/0000-0003-1228-1471>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: vladapetushkova@yandex.ru

Когарко Бронислав Станиславович (Kogarko Bronislav Stanislavovich), <https://orcid.org/0000-0002-3879-1528>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: bkogarko@yahoo.com

Ктиторова Ольга Владимировна (Ktitorova Olga Vladimirovna), <https://orcid.org/0000-0002-3578-9641>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

(N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: helgena@gmail.com

Нейфах Евгений Александрович (Neyfakh Evgeniy Aleksandrovich), <https://orcid.org/0000-0002-4072-9352>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: evneyf@yandex.ru

Ганеев Игорь Ирэкович (Ganeev Igor Irekovich), <https://orcid.org/0000-0002-3585-9611>, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: iiganeev@yandex.ru

Кузьмина Нина Станиславовна (Kuzmina Nina Stanislavovna), <https://orcid.org/0000-0002-2441-0122>, 1, ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва (Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 2. Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия (N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia); e-mail: nin-kuzmin@yandex.ru