

Е.Ю. Москалева¹, О.В. Высоцкая¹, Е.С. Жорова², Д.А. Шапошникова¹,
В.П. Сапрыкин³, И.В. Чешигин¹, О.Д. Смирнова¹, А.С. Жирник¹

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ γ , n -ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ: СНИЖЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР И РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный

Контактное лицо: Елизавета Юрьевна Москалева, e-mail: moskalevaey@mail.ru, Moskaleva_EY@nrcki.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Исследование длины теломер (ДТ) клеток костного мозга (КМ) и тимуса в качестве маркера репликативного старения в отдаленный период после окончания пролонгированного γ , n -облучения мышей в малых и умеренных дозах и анализ появления опухолей к моменту окончания эксперимента – через 14 мес.

Материал и методы: Мышей линий C57Bl/6 и CBA облучали в дозах 5–500 мГр на установке «ОР-М» с использованием Pu-Be радионуклидных источников при суммарной мощности поглощенной дозы нейтронов и гамма-квантов 2,13 мГр/ч, 75 % которой – 1,57 мГр/ч – приходилось на нейтроны со средней энергией 3,5 МэВ. Абсолютную ДТ в клетках КМ и тимуса определяли с помощью ПЦР в реальном времени через 2 и 14 мес после облучения и рассчитывали среднюю ДТ. Опухоли, обнаруженные при макроскопическом исследовании органов, подвергли гистологическому исследованию.

Результаты: Показано, что в клетках КМ и тимуса контрольных мышей линии CBA ДТ в 2 раза превышает ДТ, наблюдаемую у мышей линии C57Bl/6. Пролонгированное γ , n -облучение мышей линии C57Bl/6 через 14 мес приводило к пропорциональному дозе облучения снижению ДТ в КМ, статистически значимому при дозах 100 и 500 мГр. В тимусе снижение ДТ обнаружено только при дозе 500 мГр. У мышей линии CBA ДТ в клетках КМ была снижена независимо от дозы, начиная уже с 10 мГр, но в клетках тимуса статистически значимого снижения ДТ не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют об ускорении репликативного старения клеток КМ у мышей в отдаленный период после γ , n -облучения уже в низких дозах, а в клетках тимуса – только при дозе 500 мГр. Через 24 ч после облучения в дозах 100 и 500 мГр у мышей обеих линий было снижено количество лейкоцитов, которое восстанавливалось у мышей C57Bl/6 через неделю, а у CBA – через две недели. Через 14 мес после γ , n -облучения у мышей обеих исследованных линий обнаружено появление опухолей: у мышей CBA – аденокарциномы легкого при дозе 50 мГр (у 1 из 10) и карциносаркомы матки при дозе 500 мГр (у 1 из 10); у мышей C57Bl/6 – плоскоклеточной ороговевающей карциномы матки при дозе 500 мГр (у 2 из 10). При гистологическом исследовании печени мышей линии CBA после γ , n -облучения в дозе 500 мГр обнаружены глубокие дистрофические изменения, причины которого не ясны.

Заключение: Полученные результаты свидетельствуют о высокой биологической опасности пролонгированного γ , n -облучения при дозах свыше 10 мГр, так как уже после облучения в этой дозе обнаружено ускорение репликативного старения клеток КМ в отдаленный период, и возрастание вероятности появления опухолей при облучении в дозе 50 мГр и выше.

Ключевые слова: смешанное гамма-нейтронное излучение, длина теломер, костный мозг, тимус, отдаленные последствия, пролонгированное облучение, малые дозы, мыши

Для цитирования: Москалева Е.Ю., Высоцкая О.В., Жорова Е.С., Шапошникова Д.А., Сапрыкин В.П., Чешигин И.В., Смирнова О.Д., Жирник А.С. Отдаленные последствия γ , n -облучения мышей: снижение длины теломер и развитие опухолей // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 5. С. 11–18. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-11-18

E.Yu. Moskaleva¹, O.V. Vysotskaya¹, E.S. Zhorova², D.A. Shaposhnikova¹,
V.P. Saprykin³, I.V. Cheshigin¹, O.D. Smirnova¹, A.S. Zhirnik¹

Late Effects of γ , n -Irradiation of Mice: Shortening of Telomeres and Tumors Development

¹ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

Contact person: E.Yu. Moskaleva, e-mail: moskalevaey@mail.ru, Moskaleva_EY@nrcki.ru

ABSTRACT

Purpose: To investigate the telomere length (TL) of bone marrow and thymus cells as a marker of replicative aging late after the prolonged γ , n -irradiation of mice at low and moderate doses and analysis of the appearance of tumors by the end of the experiment – after 14 months.

Material and methods: C57Bl/6 and CBA mice were irradiated at doses of 10–500 mGy at the OR-M facility using Pu-Be radionuclide sources at a total absorbed dose rate of neutrons and gamma rays of 2.13 mGy/h, 75 % of which – 1.57 mGy/h – accounted for neutrons with an average energy of 3.5 MeV. Absolute TL in bone marrow and thymus cells was determined using real-time PCR 2 months and 1 year 2 months after irradiation, and the mean TL was calculated. Tumors found during the mice organs examination after autopsy were subjected to histological examination.

Results: It was shown that the TL in bone marrow and thymus cells of control CBA mice was 2 times higher than the TL observed in C57Bl/6 mice. Prolonged γ , n -irradiation of C57Bl/6 mice led to a dose-dependent decrease in TL in bone marrow cells 14 months after exposure, which was statistically significant at doses of 100 and 500 mGy. A decreased TL in the thymus was found only at a dose of 500 mGy. During this period, TL in bone marrow cells of CBA mice was reduced in dose-independent manner, starting from as low as 10 mGy, but no statistically significant decrease in TL was found in the thymus. The results obtained indicate the acceleration of replicative senescence of bone marrow cells in mice in the long term period after γ , n -irradiation already at low doses, and in thymus cells only at a dose of 500 mGy. Twenty-four hours after irradiation at doses of 100 and 500 mGy the number of leukocytes in mice of both lines was reduced, which was recovered in C57Bl/6 mice after a week, and in CBA mice – after two weeks. In 14 months after γ , n -irradiation, the appearance of tumors was found in mice of both studied lines: in CBA mice, lung adenocarcinoma at a dose of 50 mGy (in 1 out of 10) and uterine carcinosarcoma at a dose of 500 mGy (in 1 out of 10); in C57Bl/6 mice, keratinizing squamous cell carcinoma of the uterus at a dose of 500 mGy (2 out of 10) was seen in the absence of tumors in control mice. Histological examination of the liver of CBA mice after γ , n -irradiation at a dose of 500 mGy revealed deep dystrophic changes, the causes of which are not clear.

Conclusion: The results obtained indicate a high biological hazard of prolonged γ , n -irradiation at doses above 10 mGy, since after irradiation at this dose, an acceleration of replicative senescence of bone marrow cells in the long-term period was found, and the possibility of tumor formation increases after irradiation at a dose of 50 mGy and higher.

Keywords: γ , n -irradiation, telomere length, bone marrow, thymus, late effects, prolonged exposure, neutrons, low doses, mice

For citation: Moskaleva EYu, Vysotskaya OV, Zhorova ES, Shaposhnikova DA, Saprykin VP, Cheshigin IV, Smirnova OD, Zhirnik AS. Late Effects of γ , n -Irradiation of Mice: Shortening of Telomeres and Tumors Development. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(5):11–18. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-11-18

Введение

В медицинской радиологии изучение биологического действия нейтронов актуально в связи с развитием адронной терапии с применением протонов и нейтронов. Использование пучков протонов в терапии злокачественных опухолей сопровождается образованием вторичных нейтронов, которые могут оказывать негативное действие на нормальные ткани пациентов [1, 2]. Облучению вторичными нейтронами в низких дозах, кроме того, могут подвергаться космонавты при полетах на высоких орбитах и в дальних космических полетах и, в некоторых случаях, сотрудники ряда предприятий в результате профессионального облучения [3].

При облучении радиорезистентных опухолей быстрыми нейтронами в клинической практике получены хорошие результаты по локальному контролю роста опухолей и улучшению качества жизни больных при лечении местнораспространенного рака молочной железы и его рецидивов, при лечении резистентных опухолей слюнной железы, щитовидной железы и рака гортани [4]. Однако при такой терапии нормальные ткани также могут подвергаться действию низких доз нейтронов, что может приводить в отдаленный период к нежелательным последствиям, к которым относится ускоренное старение клеток облученных тканей и их злокачественная трансформация.

Развитие опухолей у мышей и крыс в отдаленный период после облучения нейтронами обнаружено при таких низких дозах, как 100 и 200 мГр [5]. Частота развития опухолей разных типов у мышей четырех линий в диапазоне 0,125–2 Гр была пропорциональна дозе облучения нейтронами [6]. Данные о влиянии облучения млекопитающих нейтронами в диапазоне малых и умеренных доз на процессы старения отсутствуют, хотя известно, что биологическое старение является благоприятным фоном для снижения активности иммунной системы и развития ряда заболеваний, включая повышение частоты появления злокачественных новообразований.

Репрезентативным маркером репликативного старения клеток может служить длина теломер (ДТ) хромосом пролиферирующих клеток. Теломеры – участки ДНК на концах хромосом, которые состоят из повторяющихся некодирующих шестичленных последовательностей TTAGGG, связанных с белками, образующими шелтериновый комплекс, который защищает теломеры от повреждений. Основная функция теломер – защита

концевых участков хромосомной ДНК от потери генетического материала в результате «недорепликации» концевых участков, которая происходит при каждом делении клетки. ДТ лейкоцитов периферической крови у человека снижается с возрастом [7] и может быть прогностическим маркером радиочувствительности и предрасположенности к заболеваниям [8–10]. В организме наиболее радиочувствительными являются быстро пролиферирующие клетки костного мозга и тимуса – органов, которые обеспечивают кроветворение и иммунитет.

В связи с этим целью работы явилось исследование ДТ в качестве маркера репликативного старения клеток костного мозга и тимуса в отдаленный период после окончания пролонгированного γ , n -облучения мышей в малых и умеренных дозах и анализ появления опухолей к моменту окончания эксперимента – через 14 мес.

Материал и методы

Лабораторные животные

В экспериментах использовали 60 самок мышей линий C57Bl/6 и 50 самок СВА в возрасте 7–8 недель, массой 18–21 г, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали по 5 особей в клетке, в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт».

Облучение мышей при действии пролонгированного γ , n -излучения

Перед облучением было сформировано 6 групп по 10 мышей линии C57Bl/6: контрольная и группы для облучения в дозах 5, 10, 50, 100 и 500 мГр и 5 групп по 10 мышей линии СВА: контрольная и группы для облучения в дозах 10, 50, 100 и 500 мГр. Облучение мышей в дозах 5–500 мГр проводили на установке «ОР-М» НИЦ «Курчатовский институт» с использованием пяти Pu-Be радионуклидных источников, расположенных соответствующим образом в пространстве, при котором было смоделировано поле нейтронов и гамма-квантов на передней стенке клетки с биообъектами, близкое к равномерному. Энергетические спектры и поглощенные дозы излучений измерены с помощью цифрового спектрометра-дозиметра нейтронов и гамма-квантов, являющегося составной частью радиометрическо-

го комплекса установки «ОР-М» НИЦ «Курчатовский институт». Подробное описание дозиметрических измерений и расчетов и технология облучения описаны ранее [11]. В контрольной точке на расстоянии 20 см от источников, соответствующей центру клетки с животными, суммарная мощность поглощённой дозы нейтронов со спектром деления и гамма-квантов с энергией выше 0,1 МэВ составляла 2,13 мГр/ч, при этом на нейтроны приходилось 75 % мощности поглощённой дозы – 1,57 мГр/ч.

Определение абсолютной длины теломера

Через 2 и 14 мес после окончания облучения контрольных и облученных животных подвергали эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекали костный мозг и тимус для определения ДТ. Клетки костного мозга вымывали из каждой бедренной кости мыши 0,5 мл фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) и собирали при центрифугировании. Осадок клеток костного мозга после промывания фосфатно-солевым буфером и тимус до исследования хранили при –80 °С. Абсолютную ДТ определяли с помощью ПЦР в реальном времени, как описано ранее в [12]. Геномную ДНК из собранных препаратов костного мозга и тимуса выделяли при использовании набора ExtractDNA Blood («Евроген», Россия). Праймеры для определения ДТ: teloF 5'-cgggtgttgggttgggttgggttgggttgggtt-3', teloR 5'-ggctgccttacccttacccttacccttacccttaccct-3'. В качестве стандарта для определения ДТ использовали матрицу TelSta (ttagggttggg). Праймеры для однокопийного гена $m\beta$ -актина: ActF: 5'-cttagctgtgttcttgcactcc-3', ActR: 5'-cagaagccsacaagaacactc-3'. В качестве стандарта однокопийного гена использовали матрицу гена $m\beta$ -Актина: 5'-cttagctgtgttcttgcactcccttgcattgtctcagatctatccatacagttcacctgcctgagtggttcttgggttcttgc-3'. ДТ в каждом образце измеряли трижды и использовали среднее значение. По стандартным кривым определяли ДТ в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.) и количество копий $m\beta$ -Актина в реакции. Для расчёта средней ДТ на диплоидный геном мыши нормировали ДТ к количеству копий $m\beta$ -Actin: т.п.н. теломер/количество копий $m\beta$ -Actin, что соответствует ДТ в т.п.н./геном.

Гистологическое исследование

После извлечения у мышей костного мозга и тимуса проводили ревизию органов для макроскопического выявления опухолей (легкое, кишечник, селезенка, паховые лимфоузлы, почки, надпочечники, матка, яичники). В случае обнаружения новообразований органы извлекали и кусочки ткани фиксировали в 10 %-ом нейтральном формалине. Для исследования их подвергали обычной гистологической обработке с заливкой в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Исследование препаратов проводили на микроскопе AxioImager D2 (CarlZeiss, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Origin. Результаты представлены в виде средних значений \pm погрешность среднего. Значения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для контроля степени нарушения кроветворения у мышей после окончания общего пролонгированного γ , n -облучения в дозах 5–500 мГр анализировали количество лейкоцитов периферической крови (табл. 1). Снижение этого показателя через 1 сут после воздействия обнаружено только при дозах 100 мГр (до 80,8 \pm 6,9 % и

82,0 \pm 5,6 % от контроля для линий C57Bl/6 и CBA соответственно) и 500 мГр (до 73,1 \pm 6,2 % и 57,3 \pm 3,4 % для C57Bl/6 и CBA соответственно). У мышей линии C57Bl/6 уже через 1 нед количество лейкоцитов не отличалось от уровня контроля, в то время как у мышей линии CBA после облучения в дозе 500 мГр в это время оно было ещё снижено до 73,3 \pm 5,6 % и возвращалось к уровню контроля только через 2 нед. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой радиочувствительности мышей линии CBA.

В последующие сроки исследования вплоть до 14 мес после воздействия количество лейкоцитов периферической крови облученных мышей обеих линий не отличалось от этого показателя у контрольных животных. Гибели контрольных и облученных животных за время исследования не было, вес облученных мышей не отличался от контроля.

Таблица 1

Количество лейкоцитов в периферической крови у мышей линий C57Bl/6 и CBA в динамике после окончания пролонгированного γ , n -облучения

The number of leukocytes in peripheral blood in C57Bl/6 and CBA mice in dynamics after the end of prolonged γ , n -irradiation

Группа	Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л				
	Время после облучения				
	1 сут	1 нед	2 нед	4 нед	14 мес
Мыши линии C57Bl/6					
Контроль	13,0 \pm 0,4	14,0 \pm 0,8	12,0 \pm 0,9	13,5 \pm 0,6	11,2 \pm 0,8
5 мГр	12,2 \pm 1,1	15,1 \pm 0,7	11,2 \pm 0,9	11,7 \pm 1,2	9,5 \pm 0,5
10 мГр	13,3 \pm 0,5	–	–	–	–
50 мГр	11,5 \pm 0,8	14,0 \pm 0,7	12,1 \pm 1,2	12,2 \pm 0,7	11,1 \pm 0,6
100 мГр	10,5 \pm 0,9*	11,9 \pm 0,8	13,3 \pm 1,0	12,9 \pm 1,1	11,2 \pm 0,6
500 мГр	9,5 \pm 0,8*	12,6 \pm 0,8	13,9 \pm 0,9	13,1 \pm 0,8	12,0 \pm 0,9
Мыши линии CBA					
Контроль	8,9 \pm 0,6	9,0 \pm 0,3	8,4 \pm 0,5	9,8 \pm 0,4	7,8 \pm 0,8
10 мГр	9,6 \pm 0,8	9,3 \pm 0,4	8,6 \pm 0,7	10,1 \pm 0,6	8,0 \pm 1,1
50 мГр	9,7 \pm 0,9	9,4 \pm 0,6	7,5 \pm 0,5	9,7 \pm 0,6	6,8 \pm 0,8
100 мГр	7,3 \pm 0,5*	9,9 \pm 0,6	9,4 \pm 0,8	10,1 \pm 0,8	9,7 \pm 1,2
500 мГр	5,1 \pm 0,3*	6,6 \pm 0,5*	8,3 \pm 0,5	9,4 \pm 0,8	8,2 \pm 0,7

Примечание: Приведены средние значения \pm стандартная погрешность среднего. * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

При исследовании ДТ показано, что в клетках костного мозга контрольных мышей линии C57Bl/6 в возрасте 4 и 16 мес этот показатель составил 21,5 \pm 2,9 и 22,4 \pm 5,2 т.п.н./геном, а в тимусе – 21,2 \pm 5,6 и 24,5 \pm 3,6 т.п.н./геном соответственно (рис. 1). Таким образом, ДТ в клетках костного мозга и тимуса у мышей C57Bl/6 была одинакова и не изменилась при увеличении возраста животных в интервале от 4 до 16 мес.

Через 2 мес после окончания пролонгированного γ , n -облучения ДТ в клетках этих органов у мышей C57Bl/6 не отличалась от контроля (рис. 1а, б), но спустя 14 мес после воздействия в клетках костного мозга было обнаружено пропорциональное дозе облучения снижение ДТ (уравнение линии регрессии $y = 18,8 - 14,3x$, $p = 0,03$, $R = -0,91$), которое при дозах 100 и 500 мГр было статистически значимым (рис. 1а). В тимусе мышей C57Bl/6 снижение ДТ также коррелировало с дозой облучения (уравнение линии регрессии $y = 24,2 - 0,02x$, $p = 0,01$, $R = -0,96$) в этот период, но статистически значимое снижение ДТ было установлено только при дозе 500 мГр (рис. 1б). Следует отметить, что в отдалённый период снижение ДТ в костном мозге и тимусе имело место при тех же дозах, при которых наблюдали снижение количества

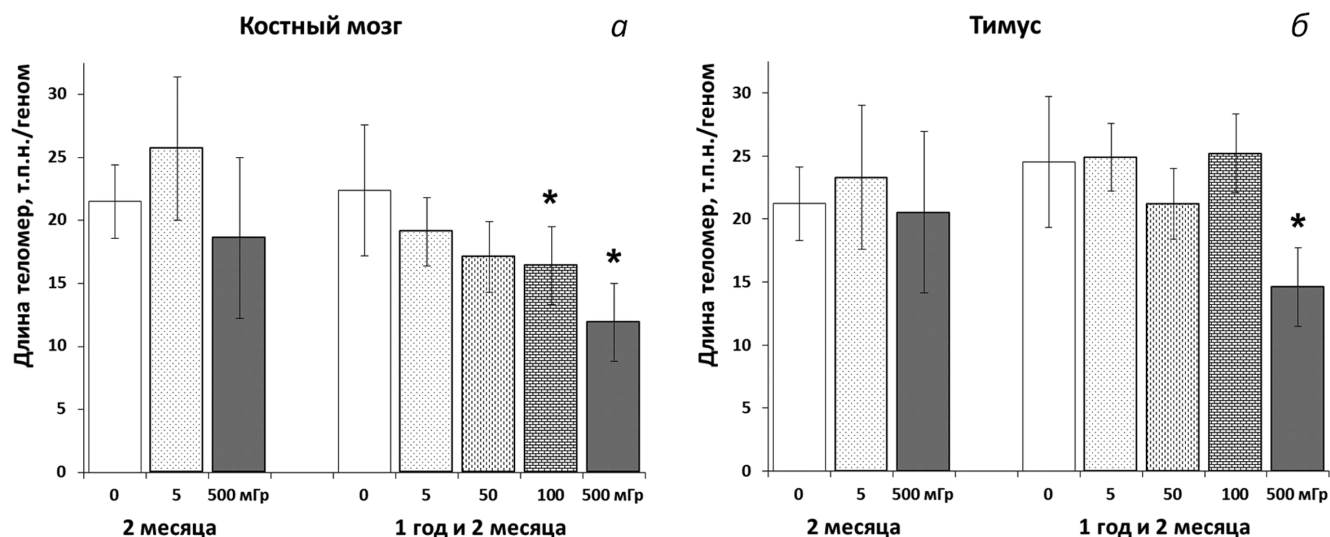


Рис. 1. Длина теломер в клетках костного мозга (а) и тимуса (б) мышей линии C57Bl/6 через 2 мес и через 14 мес после окончания пролонгированного γ , n -облучения в дозах 5–500 мГр

Fig. 1. Telomere length in bone marrow (a) and thymus (б) cells of C57Bl/6 mice 2 months and 14 months after the end of prolonged γ , n -irradiation at doses of 5–500 mGy

лейкоцитов в периферической крови животных через 1 сут после воздействия (табл. 1).

Повышение доли коротких теломер в культивируемых опухолевых клетках человека разных линий и в лимфоцитах периферической крови после γ -облучения клеток *in vitro* в дозах 10 Гр и 1 Гр соответственно было обнаружено через 10 сут после воздействия [13]. Снижение ДТ также было показано нами ранее в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках, полученных из костного мозга мышей линии C57Bl/6, в отдаленный период – через 2 мес – после γ -облучения клеток в дозах 1 и 6 Гр [12]. Однако в экспериментах *in vivo* в настоящей работе снижение ДТ обнаружено только спустя более длительное время, что может быть связано как с более медленной пролиферацией клеток в организме, чем в культуре клеток, так и с постоянным выходом части зрелых клеток в периферическую кровь.

В клетках костного мозга и тимуса контрольных мышей линии СВА в возрасте 16 мес ДТ также была одинакова и составила $47,5 \pm 2,1$ и $54,7 \pm 2,5$ т.п.н./геном соответственно (рис. 2). Таким образом, ДТ у мышей линии СВА в 2 раза превышала ДТ, наблюдаемую у мышей линии C57Bl/6, что коррелирует с данными, полученными в отношении средней ДТ в клетках печени у животных этих двух линий [13]. Как известно, ДТ у мышей дикого происхождения значительно короче, чем у длительно скрещиваемых животных инбредных линий, и у инбредных линий мышей отсутствует корреляция ДТ с продолжительностью жизни. Поэтому ДТ в пролиферирующих клетках мышей коррелирует с продолжительностью жизни клеток, но не является фактором, определяющим продолжительность жизни животных [14]. Отметим, что у человека ДТ значительно короче: у здоровых детей 2–3 лет она составляет 15,56 т.п.н. [15], у взрослых мужчин и женщин в возрасте 35–45 лет – около 5,6 т.п.н., и ДТ постепенно снижается после 55 лет [7].

В отдаленный период после γ , n -облучения мышей линии СВА в дозах 10–500 мГр, так же как и у мышей линии C57Bl/6, обнаружено снижение ДТ в клетках костного мозга, но корреляция с дозой облучения в этом диапазоне доз отсутствовала. В клетках тимуса мышей СВА при этих дозах статистически значимого снижения ДТ не наблюдали (рис. 2). Особенности пострадиационных изменений ДТ у мышей линии СВА по сравнению

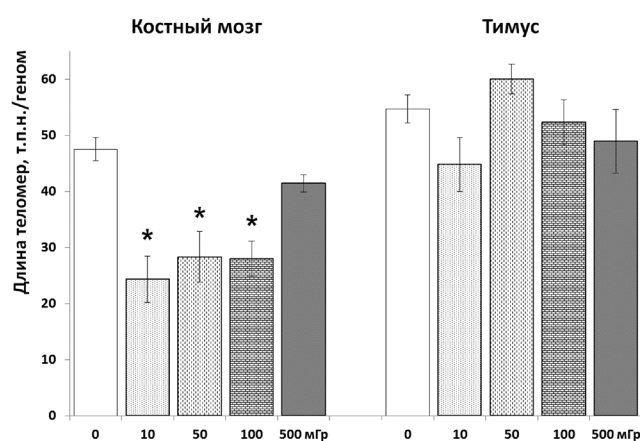


Рис. 2. Длина теломер в клетках костного мозга и тимуса мышей линии СВА через 14 мес после окончания пролонгированного γ , n -облучения в дозах 10–500 мГр

Fig. 2. Telomere length in bone marrow and thymus cells of CBA mice 14 months after the end of prolonged γ , n -irradiation at doses of 10–500 mGy

с мышами C57Bl/6 могут быть связаны с исходно более длинными теломерами у мышей СВА.

ДТ в клетках определяется генетическими особенностями организма и действием тех эндогенных и экзогенных повреждающих факторов, влияние которых испытывает человек или экспериментальные животные на протяжении жизни. Укорочение теломер, как отмечено выше, принято считать маркером репликативного старения клеток. Представленные в настоящей работе результаты позволяют заключить, что пролонгированное γ , n -облучение мышей уже в низких дозах в отдаленный период, соизмеримый с половиной продолжительности жизни мышей, приводит к развитию репликативного старения клеток костного мозга. Клетки тимуса более устойчивы к снижению ДТ, что может быть связано с их более медленной пролиферацией и выходом в кровоток. Укорочение теломер рассматривают как прогностический маркер увеличения риска развития заболеваний [16], в том числе рака [17].

Через 14 мес после облучения у мышей проводили ревизию внутренних органов для выявления опухолей у

контрольных и облученных животных. У контрольных мышей опухоли обнаружены не были. Примеры новообразований, идентифицированных у облученных мышей, представлены на рис. 3, их гистологическое строение – на рис. 4–6, их частота – в табл. 2.

При гистологическом исследовании новообразований показано, что опухоли матки у мышей C57Bl/6 представляли собой плоскоклеточные ороговевающие карциномы (рис. 4а). У мышей линии CBA была обнаружена карциносаркома (рис. 4б, в), состоящая из элементов эпителиального компонента, который был представлен аденокарциномой разной степени дифференцировки (рис. 4б), и эндометриальной стромальной саркомой (рис. 4в). Выражен полиморфизм и атипизм клеток опухоли. Встречаются участки светлоклеточной карциномы. Отмечено значительное количество симпластов (рис. 4б).

Опухоль, обнаруженная в левом легком у мыши CBA после облучения в дозе 50 мГр (рис. 3), при гистологи-

Таблица 2

Тип и частота развития патологических изменений у мышей самок C57Bl/6 и CBA через 14 мес после окончания пролонгированного γ , n -облучения в низких дозах

Type and the incidence of neoplasms in C57Bl/6 and CBA female mice 14 months after the end of prolonged γ , n -irradiation at low doses

Линия мышей	Доза облучения, мГр	Патологические изменения		
		Локализация	Тип	Частота
C57Bl/6	500	Матка	Опухоль – плоскоклеточная ороговевающая карцинома	2/10
CBA	50	Легкое	Опухоль – бронхоальвеолярная аденокарцинома	1/10
	100	Печень	Дистрофия	2/10
	500			6/10
	500	Матка	Опухоль – карциносаркома	1/10

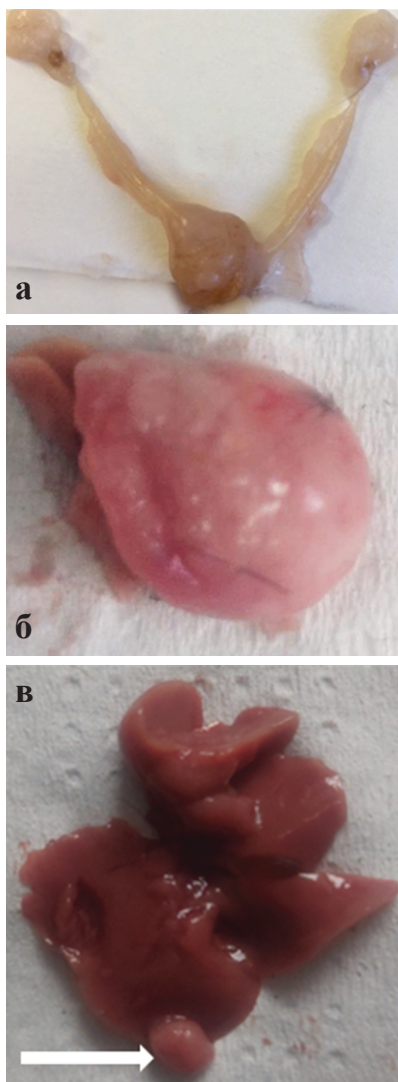


Рис. 3. Примеры патологических изменений, обнаруженных у мышей через 14 мес после γ , n -облучения: а – опухоль матки у мыши линии C57Bl/6 (500 мГр); б – увеличенная левая доля легкого мыши CBA (50 мГр); в – шарообразное образование в печени у мыши линии CBA (показано стрелкой)

Fig. 3. Examples of pathological changes found in mice 14 months after γ , n -irradiation: а – uterine tumor in a C57Bl/6 mouse (500 mGy); б – enlarged left lobe of the lung of the CBA mouse (50 mGy); в – spherical formation in the liver of a CBA mouse (shown by an arrow)

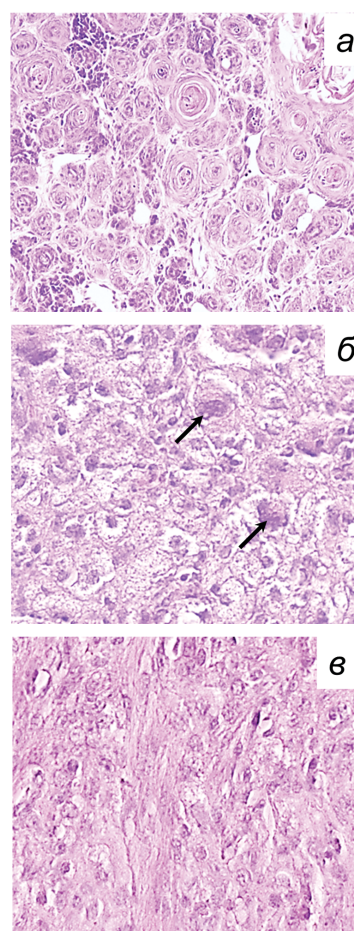


Рис. 4. Гистологическое строение опухолей матки, обнаруженных у мышей линий C57Bl/6 (а) и CBA (б, в) через 14 мес после γ , n -облучения в дозе 500 мГр. а – ороговевающая плоскоклеточная карцинома, объектив $\times 20$; б – карциносаркома матки, фрагмент аденокарциномы (стрелками указаны симпласты), объектив $\times 40$; в – карциносаркома матки, саркоматозный элемент, объектив $\times 40$

Fig. 4. Histological structure of uterine tumors found in C57Bl/6 (а) and CBA (б, в) mice 14 months after γ , n -irradiation at a dose of 500 mGy. а – keratinizing squamous cell carcinoma, $\times 20$ lens; б – uterine carcinosarcoma, fragment of adenocarcinoma (arrows indicate symplasts), $\times 40$ lens; в – uterine carcinosarcoma, sarcomatous element, $\times 40$ lens

ческом исследовании классифицирована как инвазивная бронхоальвеолярная аденокарцинома (рис. 5а). Опухоль представлена железистыми или железисто-фиброзными папиллярными образованиями, покрытыми призматическим эпителием. Железистые образования расположены

относительно друг друга беспорядочно с небольшим количеством связующей стромы между ними. Отмечена атипическая гиперплазия эпителия с образованием многорядных структур. Наряду с гиперхромными клетками встречаются крупные светлые, иногда перстневидные клетки. Опухоль не отграничена капсулой и распространяется по альвеолам и лимфатическим путям в окружающие ткани.

В правом легком при гистологическом исследовании обнаружено очаговое геморрагическое пропитывание ткани (рис. 5б). Участки ателектаз перемежаются с очагами эмфизематозного расширения альвеол и истончения межальвеолярных перегородок. В паренхиме лёгкого отмечены участки гиперплазии и метаплазии бронхиального и альвеолярного эпителия со слабо выраженным образованием папиллярных структур (рис. 5б). Имеются скопления крупных атипичных клеток. Встречаются участки гиперплазии и метаплазии эпителия. Таким образом, в правом легком также обнаружен новый опухолевый узел, который может происходить в результате метастазирования клеток из первичного опухолевого узла в левом легком или появляться в результате мультицентрического формирования опухоли.

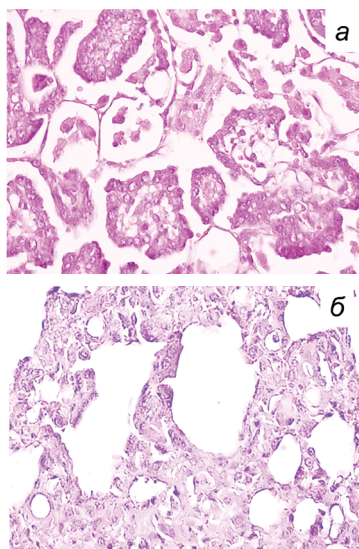


Рис. 5. Опухолевые (а) и предопухолевые (б) изменения в лёгком мыши линии СВА через 14 мес после пролонгированного γ , n -облучения в дозе 50 мГр, объектив $\times 40$. а – левое легкое, бронхоальвеолярная аденокарцинома; б – правое легкое, гиперпластические и метапластические изменения паренхимы

Fig. 5. Tumor (a) and pre-tumor (б) changes in the lung of a CBA mouse 14 months after prolonged γ , n -irradiation at a dose of 50 mGy, $\times 40$ lens. а – left lung, bronchoalveolar adenocarcinoma; б – right lung, hyperplastic and metaplastic changes in the parenchyma

При исследовании печени мышей СВА с необычными округлыми образованиями (рис. 3в) и изменённой структурой долек обнаружена резко выраженная гиалиново-капельная и гидропическая дистрофия паренхимы (рис. 6). У мышей линии C57Bl/6 таких образований не наблюдали.

Архитектоника органа нарушена, выражена дискомплексация печёночных балок. Гепатоциты набухшие, увеличены в объёме, границы нечеткие. Их содержимое имеет вид зерен, капель, вакуолей. Цитоплазма заполнена эозинофильными гиалиноподобными белковыми каплями и глыбками разных размеров, иногда сливающимися. Для гидропической дистрофии характерно появление в клетке вакуолей, наполненных цитоплазматиче-

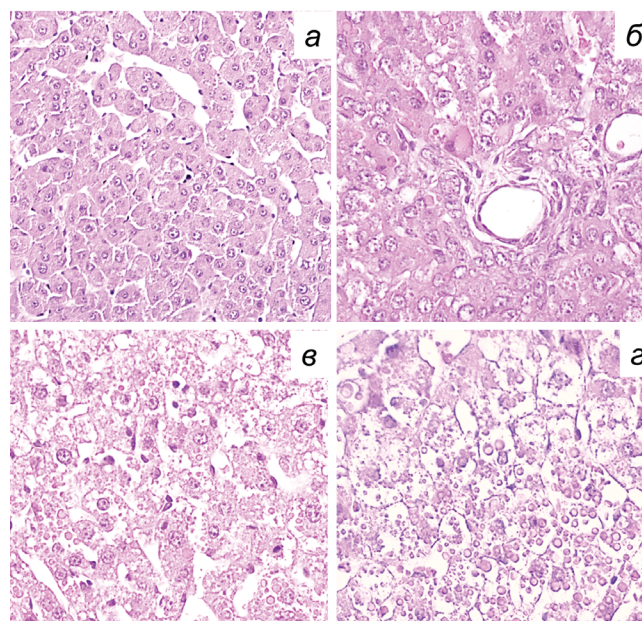


Рис. 6. Дистрофические изменения печени мыши линии СВА после γ , n -облучения в дозе 500 мГр. а – начальные изменения в виде зернистой дистрофии гепатоцитов; б – прогрессирование гиалиново-капельной и вакуольной дистрофии; в – резко выраженная гиалиново-капельная и гидропическая дистрофия; г – баллонная дистрофия; а, б, и г – объектив $\times 40$, в – объектив $\times 20$.

Fig. 6. Dystrophic changes in the liver of CBA mice after γ , n -irradiation at a dose of 500 mGy. а – initial changes in the form of granular dystrophy of hepatocytes; б – progression of hyaline-droplet and vacuolar dystrophy; в – pronounced hyaline-droplet and hydropic dystrophy; г – balloon dystrophy; а, б, and г – $\times 40$ lens, в – $\times 20$ lens

ской жидкостью. В цитоплазме гепатоцитов видно множество мелких вакуолей. Некоторые печеночные клетки в состоянии баллонной дистрофии. Гидропическая, или вакуольная, дистрофия может быть следствием гиалиново-капельной дистрофии. Часть гепатоцитов подвергается некрозу, цитоплазма сплошь занята вакуолями, ядра пикнотичные. Очаги опухолевого роста отсутствуют.

Таким образом, при микроскопическом исследовании печени показано, что новообразования, обнаруженные в печени облученных в дозе 500 мГр мышей линии СВА при макроскопическом исследовании, представляют собой не опухоли, а участки гипертрофии ткани на фоне дистрофических изменений печени неясного генеза, вызванных γ , n -облучением. Причины появления таких изменений не ясны.

Проведенное гистологическое исследование новообразований, возникших у облученных мышей обеих исследованных линий через 14 мес после воздействия, позволяет констатировать, что в отдаленный период после пролонгированного γ , n -облучения в дозах 5–500 мГр злокачественные опухоли в разных органах при макроскопическом исследовании обнаружены только после облучения в дозах 50 и 500 мГр. Кроме того, у мышей линии СВА после облучения в дозах 100 и 500 мГр были констатированы дистрофические изменения печени (табл. 2). При дозах менее 50 мГр опухоли обнаружены не были.

Для оценки риска канцерогенного действия γ , n -излучения необходимо оценивать частоту появления опухолей, возникающих у мышей на протяжении всей жизни при гистологическом исследовании всех органов павших животных и одновременном определении продолжительности их жизни. В таких исследованиях показана высокая частота развития опухолей после γ , n -облучения и её зависимость от генетических особен-

ностей и пола животных. Так, частота возникновения опухолей печени у необлученных контрольных мышей составила 0 % для обоих полов у мышей C57BL/6N, 11,7 % у самцов и 0 % у самок C3B6F1 и 39,5 % у самцов и 11,4 % у самок мышей C3H/HeN через 13 мес наблюдения, а после однократного облучения нейтронами деления ^{252}Cf в дозах 12,5; 50 и 200 сГр частота появления опухолей была пропорциональна полученной дозе у самцов и самок, у самок она была ниже. Частота появления опухолей печени была наиболее высокой у мышей C3H/HeN обоего пола, затем следовали мыши B6C3F1 и C3B6F1. Мыши C57BL/6 были наиболее устойчивы к индукции опухолей печени после облучения нейтронами, но частота спонтанных и индуцированных лимфом у них была высокой, особенно у самцов. Кроме того, у этих мышей были обнаружены опухоли надпочечников, у самок – спонтанные и индуцированные опухоли яичников, а также другие более редкие варианты опухолей [6].

В настоящем исследовании животных подвергали эвтаназии через 14 мес от начала эксперимента в возрасте 16 мес, что соответствует примерно половине продолжительности жизни мышей, хотя увеличение частоты появления опухолей после облучения нейтронами обнаруживают, когда возраст животных превышает 500 сут, начало гибели животных – после 700 сут [18]. Микроскопическое исследование всех органов контрольных и облученных мышей после эвтаназии для выявления очагов злокачественной трансформации нами не проводилось, поэтому действительное количество опухолей, особенно лимфом, возникающих после γ , n -облучения животных в использованных нами дозах на протяжении всей жизни, в действительности может быть значительно более высоким. Несмотря на то, что представленные результаты не позволяют оценить риск развития опухолей при указанных условиях облучения мышей нейтронами, они убедительно свидетельствуют о высокой биологической

опасности пролонгированного γ , n -облучения мышей уже в дозе 50 мГр и выше. При этой дозе в отдаленный период после облучения показано репликативное старение клеток костного мозга, а при дозе 500 мГр – и тимуса, и возрастает вероятность появления опухолей. Кроме того, необходимо отметить, что ранее нами было показано возникновение цитогенетических нарушений в клетках костного мозга уже после облучения мышей в дозе 10 мГр и выше, которые могут лежать в основе злокачественной трансформации клеток [11].

Представленные результаты позволяют полагать, что исследование ДТ в лейкоцитах периферической крови человека может оказаться полезным прогностическим показателем для мониторинга риска появления неблагоприятных пострадиационных изменений в организме в отдаленный период после профессионального или аварийного смешанного облучения.

Выводы

1. Пролонгированное γ , n -облучение мышей линий C57BL/6 и CBA в дозе 50 мГр и выше вызывает ускорение репликативного старения клеток костного мозга, регистрируемого по снижению ДТ.
2. В тимусе мышей ускорение репликативного старения клеток обнаружено только после γ , n -облучения в дозе 500 мГр.
3. В отдаленный период – через 14 мес – после окончания пролонгированного γ , n -облучения в дозе 50 мГр у мышей линии CBA обнаружена злокачественная опухоль легкого, а после облучения в дозе 500 мГр у мышей линий C57BL/6 и CBA обнаружено появление злокачественных опухолей матки.
4. В печени мышей линии CBA после облучения в дозе 500 мГр обнаружены глубокие дистрофические изменения, причины которых не ясны.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gerweck L.E., Huang P., Lu H.M., Paganetti H., Zhou Y. Lifetime Increased Cancer Risk in Mice Following Exposure to Clinical Proton Beam-Generated Neutrons // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. V.89, No. 1. P. 161–166. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.01.057.
2. Schneider U., Hälgl R. The Impact of Neutrons in Clinical Proton Therapy // *Front. Oncol.* 2015. No. 5. P. 235. DOI: 10.3389/fonc.2015.00235.
3. Stricklin D.L., VanHorne-Sealy J., Rios C.I., Scott Carnell L.A., Taliaferro L.P. Neutron Radiobiology and Dosimetry // *Radiat Res.* 2021. V.195, No. 5. P. 480–496. DOI: 10.1667/RADE-20-00213.1.
4. Великая В.В., Старцева Ж.А., Лисин В.А., Симонов К.А., Попова Н.О., Гольдберг В.Е. Отдаленные результаты комплексного лечения с применением нейтронной терапии у больных местнораспространенным раком молочной железы // *Радиация и риск.* 2018. Т.27, № 1. С. 107–114. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-107-114.
5. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Human Carcinogens. Radiation. V.100D. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2012. ISBN 978 92 832 1321 5.
6. Ito A., Takahashi T., Watanabe H., Ogundigie P.O., Okamoto T. Significance of Strain and Sex Differences in the Development of ^{252}Cf Neutron-Induced Liver Tumors in Mice // *Jpn. J. Cancer Res.* 1992. V.83, No. 10. P. 1052–1056. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1992.tb02721.x.
7. Honig L.S., Kang M.S., Cheng R., Eckfeldt J.H., Thyagarajan B., Leiendecker-Foster C., et al. Heritability of Telomere Length in a Study of Long-Lived Families // *Neurobiology of Aging.* 2015. V.36, No. 10. P. 2785–2790. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.017.
8. Mirjolet C., Boidot R., Saliques S., Ghiringhelli F., Maingon Ph., Créange G. The Role of Telomeres in Predicting Individual Radiosensitivity of Patients with Cancer in the Era of Personalized Radiotherapy // *Cancer Treat Rev.* 2015. V.41, No. 4. P. 354–360. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.02.005.
9. Ayoub A., Raynaud C., Heride C., Revaud D., Sabatier L. Telomeres: Hallmarks of Radiosensitivity // *Biochimie.* 2008. V.90, No. 1. P. 60–72. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.09.011.
10. Wu L., Xie X., Liang T., Ma J., Yang L., Yang J., et al. Integrated Multi-Omics for Novel Aging Biomarkers and Anti-aging Targets // *Biomolecules.* 2021. V.12, No. 1. P. 39. DOI: 10.3390/biom12010039.
11. Москалева Е.Ю., Романцова А.Н., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чешин И.В., Дегтярев А.С., и др. Анализ появления микроядер в эритроцитах и активности пролиферации клеток костного мозга после пролонгированного облучения мышей быстрыми нейтронами в низких дозах // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2021. Т.66, № 6. С. 26–33. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-26-33.
12. Высоцкая О.В., Глухов А.И., Семочкина Ю.П., Гордеев С.А., Москалева Е.Ю. Активность теломеразы, экспрессия гена mTert и длина теломер в отдаленный период после γ - и γ , n -облучения в мезенхимальных стволовых клетках и в опухолях, образовавшихся из этих клеток // *Биомедицинская химия.* 2020. Т.66, № 3. С. 265–273. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-26-33.
13. Sisho B.J., Nelson C.B., McKenna M.J., Battaglia C.L., Herndon A., Idate R., et al. Telomeres and Telomerase in The Radiation Response: Implications for Instability, Reprograming, and Carcinogenesis // *Front Oncol.* 2015. No. 5. P. 257. DOI: 10.3389/fonc.2015.00257.

14. Hemann M.T., Greider C.W. Wild-Derived Inbred Mouse Strains Have Short Telomeres // *Nucleic Acids Res.* 2000. V.28, No. 22. P. 4474–4478. DOI: 10.1093/nar/28.22.4474.
15. Дёмина И.А., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2018. Т.17, № 4. С. 68–74. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-68-74.
16. Zeid D., Mooney-Leber S., Seemiller L.R., Goldberg L.R., Gould T.J. Terc Gene Cluster Variants Predict Liver Telomere Length in Mice // *Cells.* 2021. V.10, No. 10. P. 2623. DOI: 10.3390/cells10102623.
17. Kong C.M., Lee X.W., Wang X. Telomere Shortening in Human Diseases // *FEBS J.* 2013. V.280, No. 14. P. 3180–3193. DOI: 10.1111/febs.12326.
18. Zander A., Paunesku T., Woloschak G.E. Analyses of Cancer Incidence and Other Morbidities in Neutron Irradiated B6CF1 Mice // *Plos One.* 2021. V.16, No. 3: e0231511. DOI: 10.1371/journal.pone.0231511.

REFERENCES

1. Gerweck L.E., Huang P., Lu H.M., Paganetti H., Zhou Y. Lifetime Increased Cancer Risk in Mice Following Exposure to Clinical Proton Beam-Generated Neutrons. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014;89;1:161–166. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.01.057.
2. Schneider U., Hälgl R. The Impact of Neutrons in Clinical Proton Therapy. *Front. Oncol.* 2015;5:235. DOI: 10.3389/fonc.2015.00235.
3. Stricklin D.L., VanHorne-Sealy J., Rios C.I., Scott Carnell L.A., Taliaferro L.P. Neutron Radiobiology and Dosimetry. *Radiat Res.* 2021;195;5:480–496. DOI: 10.1667/RADE-20-00213.1.
4. Velikaya V.V., Startseva Z.A., Lisin V.A., Simonov K.A., Popova N.O., Goldberg V.E. Late Effects of Combined Modality Treatment with Adjuvant Neutron Therapy for Locally Advanced Breast Cancer. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk.* 2018;27;1:107–114. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-107-114 (In Russ.).
5. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Human Carcinogens. Radiation. V.100D. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2012. ISBN 978 92 832 1321 5.
6. Ito A., Takahashi T., Watanabe H., Ogundigie P.O., Okamoto T. Significance of Strain and Sex Differences in the Development of 252Cf Neutron-Induced Liver Tumors in Mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992;83;10:1052–1056. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1992.tb02721.x.
7. Honig L.S., Kang M.S., Cheng R., Eckfeldt J.H., Thyagarajan B., Leiendecker-Foster C., et al. Heritability of Telomere Length in a Study of Long-Lived Families. *Neurobiology of Aging.* 2015;36;10:2785–2790. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.017.
8. Mirjolet C., Boidot R., Saliques S., Ghiringhelli F., Maingon Ph., Créhange G. The Role of Telomeres in Predicting Individual Radiosensitivity of Patients with Cancer in the Era of Personalized Radiotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2015;41:4:354–360. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.02.005.
9. Ayoubaz A., Raynaud C., Heride C., Revaud D., Sabatier L. Telomeres: Hallmarks of Radiosensitivity. *Biochimie.* 2008;90;1:60–72. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.09.011.
10. Wu L., Xie X., Liang T., Ma J., Yang L., Yang J., et al. Integrated Multi-Omics for Novel Aging Biomarkers and Antiaging Targets. *Biomolecules.* 2021;12;1:39. DOI: 10.3390/biom12010039.
11. Moskaleva E.Yu., Romantsova A.N., Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Cheshigin I.V., Degtyarev A.S., et al. Analysis of the Appearance of Micronuclei in the Erythrocytes and Activity of Bone Marrow Cells Proliferation after the Prolonged Low Dose Fast Neutrons Irradiation of Mice. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety.* 2021;66;6:26–33. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-26-33 (In Russ.).
12. Vysotskaya O.V., Glukhov A.I., Semochkina Yu.P., Gordeev S.A., Moskaleva E.Yu. Telomerase Activity, mTert Gene Expression and the Telomere Length in Mouse Mesenchymal Stem Cells in the Late Period after γ - and γ_n -Irradiation and in Tumors Developed from These Cells. *Biomedical Chemistry.* 2021;15;1:80–88. DOI: 10.1134/S199075082101008X (In Russ.).
13. Sishc B.J., Nelson C.B., McKenna M.J., Battaglia C.L., HERNON A., Idate R., et al. Telomeres and Telomerase in The Radiation Response: Implications for Instability, Reprogramming, and Carcinogenesis. *Front Oncol.* 2015;5:257. DOI: 10.3389/fonc.2015.00257.
14. Hemann M.T., Greider C.W. Wild-Derived Inbred Mouse Strains Have Short Telomeres. *Nucleic Acids Res.* 2000;28;22:4474–4478. DOI: 10.1093/nar/28.22.4474.
15. Demina I.A., Semchenkova A.A., Kagirowa Z.R., Popov A.M. Flow Cytometric Measurement of Absolute Telomere Length. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2019;17;4:68–74. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-68-74 (In Russ.).
16. Zeid D., Mooney-Leber S., Seemiller L.R., Goldberg L.R., Gould T.J. Terc Gene Cluster Variants Predict Liver Telomere Length in Mice. *Cells.* 2021;10;10:2623. DOI: 10.3390/cells10102623.
17. Kong C.M., Lee X.W., Wang X. Telomere Shortening in Human Diseases. *FEBS J.* 2013;280;14:3180–3193. DOI: 10.1111/febs.12326.
18. Zander A., Paunesku T., Woloschak G.E. Analyses of Cancer Incidence and Other Morbidities in Neutron Irradiated B6CF1 Mice. *Plos One.* 2021. V.16, No. 3: e0231511. DOI: 10.1371/journal.pone.0231511.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. НИЦ «Курчатовский институт».

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.04.2023. **Принята к публикации:** 27.05.2023.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. SIC «Kurchatov Institute».

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.04.2023. **Accepted for publication:** 27.05.2023.