

С.М. Роднева<sup>1</sup>, Л.П. Сычева<sup>1</sup>, А.А. Максимов<sup>1</sup>, Е.С. Жорова<sup>1</sup>, А.А. Цишнатти<sup>1</sup>,  
Г.С. Тищенко<sup>1</sup>, Ю.А. Федотов<sup>1,2</sup>, Т.М. Трубченкова<sup>1</sup>, Е.И. Яшкина<sup>1</sup>, Д.В. Гурьев<sup>1</sup>, В.Г. Барчуков<sup>1</sup>

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ОКСИДА ТРИТИЯ И <sup>3</sup>H-ТИМИДИНА В СЕЛЕЗЕНКЕ И КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС WISTAR ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

<sup>1</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва

Контактное лицо: Софья Михайловна Роднева, e-mail: sontyaga@yandex.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Работа объектов использования атомной энергии, в том числе АЭС, сопровождается образованием и выбросом соединений трития в окружающую среду. Имеющиеся в настоящий момент данные о биологических эффектах трития, в особенности его органических соединений, весьма разрозненны и фрагментарны. До сих пор нет единого мнения по поводу нормативного регулирования содержания неорганических и органических соединений трития в разных средах. Это приводит, например, к серьезным различиям принятых в разных странах значений допустимых уровней содержания трития в окружающей среде. Все это требует проведения дополнительных экспериментальных исследований и расчетов в целях гармонизации нормативов и обеспечения безопасности населения, проживающего вблизи предприятий, где имеет место выброс трития. Цель настоящей работы – сравнительная оценка длительного воздействия трития органической и неорганической форм на млекопитающих с использованием молекулярно-клеточных показателей.

**Материал и методы:** Проведено исследование *in vivo* на самцах крыс, получавших перорально питьевую воду, содержащую оксид трития (НТО) или органические соединения трития (ОСТ) в виде <sup>3</sup>H-тимидина с объемной активностью 800 кБк/л в течение 10, 21 и 31 сут. Оценивалось количество фокусов репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК в спленоцитах крыс методом иммуноцитохимического окрашивания фокусов фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX). Также был проведен анализ частот полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) костного мозга с микроядрами (МЯ).

**Результаты:** Определен генотоксический эффект трития обеих форм по значительному выходу ДР ДНК в спленоцитах и уровню МЯ в ПХЭ костного мозга (более выраженный эффект на 31 сут действия ОСТ). При хроническом воздействии <sup>3</sup>H-тимидина на 21 и 31 сут количество фокусов  $\gamma$ H2AX достоверно увеличивается, при этом в случае НТО уровень фокусов на 31 сут достоверно не изменяется. Воздействие НТО и <sup>3</sup>H-тимидина вызвало приблизительно одинаковую индукцию ПХЭ с микроядрами на 10 и 21 сут, однако на 31 сут эффект <sup>3</sup>H-тимидина был приблизительно на 40 % выше, чем НТО.

**Заключение:** Результат данной работы расширяет представления о мутационном процессе в клетках млекопитающих, подвергающихся воздействию внутреннего ионизирующего излучения при приеме соединений, содержащих тритий. Отмечается повышенная генотоксичность при приеме крысами питьевой воды, содержащей соединения трития с объемной активностью 800 кБк/л. Полученные данные указывают на необходимость использования дифференциального подхода при нормировании поступления соединений трития в организм.

**Ключевые слова:** тритий, тритированная вода, оксид трития, органически связанный тритий, <sup>3</sup>H-тимидин, фокусы  $\gamma$ H2AX, двунитевые разрывы ДНК, спленоциты, микроядерный тест, полихроматофильные эритроциты, крысы

**Для цитирования:** Роднева С.М., Сычева Л.П., Максимов А.А., Жорова Е.С., Цишнатти А.А., Тищенко Г.С., Федотов Ю.А., Трубченкова Т.М., Яшкина Е.И., Гурьев Д.В., Барчуков В.Г. Генотоксический эффект оксида трития и <sup>3</sup>H-тимидина в селезенке и костном мозге крыс Wistar при длительном поступлении с питьевой водой // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 5. С. 15–20. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-15-20

S.M. Rodneva<sup>1</sup>, L.P. Sycheva<sup>1</sup>, A.A. Maksimov<sup>1</sup>, E.S. Zhorova<sup>1</sup>, A.A. Tsishnatti<sup>1</sup>,  
G.S. Tishchenko<sup>1</sup>, Yu.A. Fedotov<sup>1,2</sup>, T.M. Trubchenkova<sup>1</sup>, E.I. Yashkina<sup>1</sup>, D.V. Guryev<sup>1</sup>, V.G. Barchukov<sup>1</sup>

## Genotoxic Effects in Spleen and Bone Marrow of Wistar Rats Chronically Exposed to Tritium Oxide and <sup>3</sup>H-Thymidine with Drinking Water

<sup>1</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

Contact person: Sofya Mikhailovna Rodneva, e-mail: sontyaga@yandex.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** The operation of nuclear facilities such as NPPs is accompanied by the formation and release of tritium compounds into the environment. Currently available data on the biological effects of tritium, especially its organic compounds, are very scattered and fragmentary. There is still no consensus on the regulation of the content of inorganic and organic tritium compounds in different environments. This leads, for example, to a wide range of permissible levels of tritium in the environment in different countries, which requires additional experimental and calculated data in order to harmonize standards and ensure the safety of the members of the public living near such nuclear facilities. The purpose of this work is a comparative assessment of molecular cellular biological effects (formation of DNA double-strand breaks and micronuclei) upon exposure to individual tritiated compounds in mammals.

**Material and methods:** An *in vivo* study was conducted on male rats that received orally drinking water containing tritium oxide (HTO) or  $^3\text{H}$ -thymidine with a volumetric specific activity of 800 kBq/l for 10, 21 and 31 days. The number of DNA double-strand break (DSB) repair foci in rat splenocytes was assessed by immunocytochemical staining of phosphorylated histone H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) foci. An analysis of the frequencies of polychromatophilic erythrocytes (PCE) with micronuclei (MN) in the bone marrow of rats was also carried out.

**Results:** The genotoxic effect of both forms of tritium was determined by a significant yield of DNA DSBs in splenocytes and micronuclei in bone marrow PCE (a more pronounced effect on the 31st day of  $^3\text{H}$ -thymidine action). With chronic exposure to  $^3\text{H}$ -thymidine on days 21 and 31, the number of  $\gamma\text{H2AX}$  foci significantly increases; in the case of HTO, the level of foci on days 31 does not significantly change. Exposure to HTO and  $^3\text{H}$ -thymidine caused approximately the same induction of PCE with micronuclei on days 10 and 21, but by day 31 the effect of  $^3\text{H}$ -thymidine was approximately 40 % greater than that of HTO. The experiment revealed a likely genotoxic effect of inhaled tritium in control rats that were kept in the same room as the rats that received HTO and  $^3\text{H}$ -thymidine orally. However, additional experiments are needed to confirm this effect.

**Conclusion:** The result of this work expands the understanding of the mutation process in mammalian cells exposed to internal ionizing radiation when taking compounds containing tritium. Increased genotoxicity is observed when rats ingest drinking water containing tritium with an activity of 800 kBq/l.

**Keywords:** tritium, tritiated water, organically bound tritium,  $^3\text{H}$ -thymidine,  $\gamma\text{H2AX}$  foci, DNA double-strand breaks, splenocytes, micronucleus test on polychromatophilic erythrocytes, rats

**For citation:** Rodneva SM, Sycheva LP, Maksimov AA, Zhorova ES, Tsishnatti AA, Tishchenko GS, Fedotov YuA, Trubchenkova TM, Yashkina EI, Guryev DV, Barchukov VG. Genotoxic Effects in Spleen and Bone Marrow of Wistar Rats Chronically Exposed to Tritium Oxide and  $^3\text{H}$ -Thymidine with Drinking Water. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(5):15–20. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-15-20

## Введение

В настоящее время в связи с развитием атомной энергетики продолжают оставаться острыми проблемы, связанные с нормированием трития в окружающей среде. Известно, что тритий образуется в результате работы атомных реакторов и среди выбросов радионуклидов занимает ведущую позицию [1]. Многие специалисты указывают на необходимость снижения нормативов содержания трития в окружающей среде, что обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, накапливаются данные о повышенной частоте возникновения злокачественных новообразований у населения, проживающего вблизи атомных реакторов [1]. Во-вторых, следует учесть, что при разработке нормативов в основном рассматривали эффект трития в форме тритированной воды (HTO), тогда как установлено, что тритий может поступать в организм в виде органических соединений трития (ОСТ) [2–4]. Кроме того, тритий, поступающий в организм в виде HTO, частично способен в результате химических реакций и обменных процессов образовывать ОСТ [5]. В отличие от HTO, ОСТ распределяется в клетках и тканях гетерогенно, локально создавая высокие дозы, приводящие к серьезным повреждениям органических молекул [6]. Показано, что прогнозируемые дозы облучения работников различных производств, рассчитанные по моделям кинетики ОСТ и HTO при одинаковом поступлении в организм, различаются в 2–2,5 раза [7]. В-третьих, нормативы для трития и его соединений значительно отличаются в разных странах, от 100 Бк/л в большинстве стран Европейского Союза до 7000 Бк/л в Канаде, 7600 Бк/л в России, 30000 Бк/л в Финляндии и более 76000 Бк/л в Австралии [8, 9], что требует дополнительных экспериментальных и эпидемиологических данных для их гармонизации.

В настоящее время сравнительные работы по биологическим эффектам HTO и ОСТ *in vivo* на млекопитающих малочисленны, а данные по генотоксическим эффектам этих соединений единичны. В связи с этим, целью настоящей работы являлась сравнительная оценка длительного воздействия трития органической и неорганической форм на млекопитающих с использованием молекулярно-клеточных показателей. Были решены следующие задачи:

1) Сравнительная оценка количества остаточных фокусов репарации ДР ДНК  $\gamma\text{H2AX}$  в спленоцитах крыс при хроническом поступлении с питьём HTO и  $^3\text{H}$ -тимидина;

2) Определение уровня ПХЭ с МЯ в костном мозге крыс при хроническом поступлении с питьём HTO и  $^3\text{H}$ -тимидина.

## Материал и методы

### Экспериментальные животные и соединения трития

Исследование проведено на 52 крысах-самцах Wistar, полученных из питомника ФИБХ РАН НПП «Питомник лабораторных животных» (Пущино, Московская область), имеющих массу тела  $308,2 \pm 41,6$  г на начало исследования. Эксперименты выполнены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных [10], используемых в научных целях. Животных содержали на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде и пище. Животных разделили на 3 группы: Контроль, HTO, ОСТ по 16–18 животных в каждой. Контрольные крысы получали дистиллированную воду. Животные двух других групп потребляли дистиллированную воду с соединениями трития (HTO и  $^3\text{H}$ -тимидин) с объемной активностью 800 кБк/л. Данные по полученной крысами активности представлены в табл. 1.

При выборе значения объемной активности соединений трития руководствовались наибольшим из известных нормативов допустимого содержания трития в питьевой воде 76 кБк/л, принятым в Австралии [9], увеличенным в 10 раз с учетом более высокой скорости метаболизма у крыс по сравнению с человеком и допустимости отсутствия токсических эффектов.

Животных наблюдали в течение 31 сут с ежедневными измерениями количества выпитой жидкости. Декапитацию и взятие образцов проводили на 10, 21 и 31 сут у 5–6 животных из каждой экспериментальной группы.

Для молекулярно-генетических исследований использовали селезенку и костный мозг из бедренной кости.

### Метод оценки повреждений ДНК по фокусам $\gamma\text{H2AX}$

Наиболее серьезными повреждениями клетки, индуцированными ионизирующим излучением, являются ДР ДНК. Их наличие и количественное изменение со временем коррелирует с наличием белков репарации ДР ДНК, образующих фокусы в местах повреждений ДНК или рядом с ними. Для выявления и количественной

оценки повреждений ДНК (фокусы  $\gamma$ H2AX) в клетках селезенки крыс Wistar, проводили иммуноцитохимическое окрашивание на наличие фокусов  $\gamma$ H2AX по общепринятой методике [11]. Использовали первичные кроличьи антитела против  $\gamma$ H2AX (фосфо S139, разведение 1:800, клон EP854(2)Y, Abcam, Waltham, MA, США). После нескольких промывок в фосфатно-солевом буфере, клетки инкубировали 1 час со вторичными антителами IgG (H+L) козы против мыши (конъюгированными с Alexa Fluor 488, разведение 1:1600; Abcam, Waltham, MA, США). Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (возбуждение 340–380 нм и эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм и эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм). Анализировали не менее 600 клеток на экспериментальную группу.

### Микроядерный тест на ПХЭ

Препараты клеток костного мозга для учета МЯ готовили общепринятым способом в соответствии с методическими рекомендациями [12, 13]. После декапитации костный мозг из бедренной кости вымывали с использованием эмбриональной телячьей сыворотки крови. Суспензию центрифугировали (1000 об/мин, 5 мин), супернатант сливали и из осадка готовили мазки на предметных стеклах, которые окрашивали по методу Романовского–Гимза. На зашифрованных препаратах анализировали по 1000 ПХЭ от каждого животного для учета ПХЭ с МЯ.

### Статистический анализ

Результаты статистически обрабатывали в программах Microsoft Excel и Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Определяли среднее значение показателей в группах, погрешность средней и стандартное отклонение. Межгрупповые сравнения проводили с помощью теста Манна–Уитни и по критерию  $\chi^2$ . Отличия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

#### Оценка уровня фокусов репарации ДР ДНК в клетках селезенки

В результате проведенных исследований по оценке выхода ДР ДНК на основании анализа фокусов  $\gamma$ H2AX в спленоцитах крыс, получавших в течение 10–31 сут питьевую воду, содержащую соединения трития с объемной активностью 800 кБк/л, выявлено, что как НТО, так и  $^3$ H-тимидин (непосредственно способен включаться в молекулу ДНК), вызывают статистически значимое ( $p \leq 0,005$ ) увеличение количества повреждений ДНК по сравнению с контролем, начиная с 10 сут эксперимента (табл. 1).

На 10 сут эксперимента у крыс, получавших воду с  $^3$ H-тимидином, количество фокусов  $\gamma$ H2AX было статистически значимо выше по сравнению с животными, получавшими НТО (при  $p \leq 0,05$ ).

В последующие сроки (на 21 и 31 сут) при хроническом воздействии ОСТ при межгрупповом сравнении количество фокусов  $\gamma$ H2AX достоверно увеличивается.

Таблица 1

Результаты анализа МЯ в ПХЭ костного мозга и количества фокусов  $\gamma$ H2AX в спленоцитах крыс при воздействии НТО и  $^3$ H-тимидина с объемной активностью 800 кБк/л в течение 10, 21 и 31 сут

Results of MN test in polychromatophilic red blood cells and  $\gamma$ H2AX foci number in spleen cells of rats exposed to НТО and  $^3$ H-thymidine with a volume activity of 800 kBq/l for 10, 21 and 31 days

Срок исследования, сут	Вид воздействия	Накопленная активность, кБк	Кол-во крыс в группе	Количество фокусов $\gamma$ H2AX на ядро $x_{cp} \pm m$	Количество ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ $x_{cp} \pm m$
10	Контроль	0	5	1,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,3
	НТО	250 $\pm$ 9	5	6,7 $\pm$ 0,5*	6,4 $\pm$ 1,3*
	$^3$ H-тимидин	237 $\pm$ 44	6	10,9 $\pm$ 0,5*	5,5 $\pm$ 1,3*
21	Контроль	0	6	4,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5
	НТО	491 $\pm$ 28	6	12,1 $\pm$ 0,4*	6,2 $\pm$ 1,2*
	$^3$ H-тимидин	538 $\pm$ 57	5	13,0 $\pm$ 0,3*	5,8 $\pm$ 2,1*
31	Контроль	0	6	7,5 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,8
	НТО	762 $\pm$ 4	6	11,9 $\pm$ 0,7*	6,5 $\pm$ 1,2
	$^3$ H-тимидин	811 $\pm$ 118	6	14,1 $\pm$ 0,6*	9,0 $\pm$ 1,6*

Примечание: \* Различия от одновозрастного контроля статистически значимы по критерию Манна–Уитни для фокусов  $\gamma$ H2AX; по критерию  $\chi^2$  для ПХЭ с микроядрами при  $p \leq 0,05$

В случае НТО уровень фокусов на 31 сут достоверно не изменяется по сравнению с 21 сут.

Таким образом, хроническое поступление трития в форме  $^3$ H-тимидина и НТО вызывает значительное увеличение уровня повреждений ДНК в клетках селезенки крыс, играющей важную роль в процессах кроветворения и иммунной защиты. Генотоксический эффект в случае воздействия ОСТ в форме  $^3$ H-тимидина увеличивается с течением времени, в отличие от воздействия НТО.

#### Оценка частоты ПХЭ с микроядрами

Результаты сравнительной оценки частоты встречаемости ПХЭ с МЯ в экспериментальных группах представлены в табл. 1. Средняя частота ПХЭ с микроядрами у контрольных крыс составила 2,0, 2,33 и 4,17 % на 10, 21 и 31 сут эксперимента соответственно. На 10 и 21 сут эксперимента этот показатель соответствует контрольным значениям, полученным нами в других экспериментах и отмеченным в литературе, который составляет ~2 % [14, 15]. Национальная токсикологическая программа (NTP) определяет среднюю частоту эритроцитов периферической крови с микроядрами у здоровых интактных крыс в пределах 1,66–3,16 % (исторический контроль) [16]. Следует отметить, что на 31 сут эксперимента частота ПХЭ крыс с микроядрами повышена по сравнению с 10 и 21 сут эксперимента, что коррелирует с полученными данными по фокусам репарации ДР ДНК в спленоцитах.

НТО статистически значимо повышает частоту ПХЭ с микроядрами по сравнению с контрольными группами на 10 и 21 сут воздействия в 3,2 и 2,7 раза, соответственно. На 31 сут эксперимента это повышение заметно, но статистически не достоверно. Эффект НТО не изменяется с длительностью воздействия и варьирует в небольшом диапазоне: 6,4, 6,2, 6,5 % на 10, 21 и 31 сут, соответственно.

Близкие значения частоты ПХЭ с МЯ отмечены при поступлении  $^3$ H-тимидина в течение 10 и 21 сут (5,5 и 5,8 % соответственно). После 31 сут отмечено статистически значимое повышение частоты этого показателя до 9 %.

При анализе соотношения показателя ПХЭ с МЯ на 31 сут эксперимента  $^3$ H-тимидин проявляет более высокую



мутагенную активность, чем НТО ( $p \leq 0,009$ ). Таким образом, воздействие НТО и  $^3\text{H}$ -тимидина с объемной активностью 800 кБк/л по индукции ПХЭ с микроядрами на 10 и 21 сут имели близкие значения. Однако к 31 сут эффект  $^3\text{H}$ -тимидина был на ~40 % выше, чем НТО.

### Обсуждение

В проведенном исследовании были выявлены генотоксические эффекты хронического поступления органических и неорганических соединений трития как в спленоцитах, так и в костном мозге крыс.

При анализе фокусов репарации ДР ДНК иммуноцитохимическим методом (фокусы  $\gamma\text{H2AX}$ ) в клетках селезенки было установлено увеличение их количества относительно контроля, как при воздействии НТО, так и при воздействии  $^3\text{H}$ -тимидина во все временные точки (10, 21 и 31 сут). Наряду с этим, у крыс, получавших воду с  $^3\text{H}$ -тимидином, количество фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  было статистически значимо выше, по сравнению с животными, получавшими НТО на 10 сут эксперимента, и с течением времени генотоксический эффект  $^3\text{H}$ -тимидина увеличивался. По всей видимости, это связано с особенностями метаболизма НТО, имеющего свойства обычной воды со свободным перемещением как внутрь клетки, так и за ее пределы, тем самым формируя основную дозу излучения вне ядер клетки. Известно, что распад трития сопровождается испусканием низкоэнергетических электронов, средняя длина пробега которых в биологических средах составляет всего 0,4–0,6 мкм [17]. Что касается эффективности действия  $^3\text{H}$ -тимидина, то ранее на культурах клеток нами было показано, что, при условии одинаковой объемной активности в среде культивирования,  $^3\text{H}$ -тимидин включается в клетки в несколько десятков раз активней, по сравнению с НТО [18]. Как результат, активность трития в ядрах клеток, инкубированных с  $^3\text{H}$ -тимидином, превышает его активность в ядрах клеток, инкубированных с оксидом трития, уже в сотни раз.

В случае хронического поступления НТО нами не было найдено достоверных отличий у групп, подвергавшихся воздействию в течение 21 и 31 сут.

При анализе ПХЭ костного мозга крыс с использованием микроядерного теста отмечен генотоксический эффект трития обеих форм на всех сроках исследования. В монографии IARC не рассмотрены конкретные публикации по мутагенному эффекту трития в двух формах, но указано, что все излучатели бета-частиц, в том числе тритий, индуцируют ДНК-повреждения, хромосомные aberrации и генные мутации в клетках человека. Доказательства канцерогенности трития у экспериментальных животных считают достаточными [19].

В нашем исследовании на 21 сут достигается равновесие для НТО (и для селезенки, и для костного мозга), следовательно, его дальнейшего накопления не происходит. В то же время наблюдаемые на разных сроках эффекты  $^3\text{H}$ -тимидина указывают на возможность его накопления при постоянном поступлении. Этот феномен отмечают и другие авторы. Так, в экспериментах на самках мышей было показано, что в условиях непрерывного поступления НТО содержание трития увеличивается с каждым днем до момента, когда ежедневно количество захвата компенсируется его экскрецией [20]. Тогда достигается равновесие, и содержание трития становится относительно постоянным. Согласно расчету, равновесие достигается через 10 сут хронического ежедневного поступления трития. В этом отношении для оценки токсичности соединений трития *in vivo* особый интерес представляет применение именно МЯ теста на ПХЭ мышей и крыс. Известно, что ПХЭ образуются в костном

мозге после выталкивания ядра из нормоцита, за 24 ч они превращаются в нормохромные эритроциты и выходят в кровь. Учет ПХЭ с микроядрами позволяет оценить эффект фактора, действующего в течение последних 24 ч, как бы длительно он ни действовал на организм до этого. Из табл. 1 видно, что эффект НТО приблизительно одинаков при всех исследованных сроках воздействия, тогда как эффект ОСТ повышается с длительностью. Учитывая особенности кинетики ПХЭ в костном мозге, более высокий эффект можно наблюдать только при действии более высокой дозы трития, т.е. с его накоплением в организме.

Сравнительные исследования биологического действия НТО и ОСТ *in vivo* немногочисленны. В работах [21, 22] оценивали эффект у мышей при длительном поступлении с водой НТО или ОСТ, причем одна из концентраций (1 МБк/л) была близка к использованной в нашем эксперименте. Однако в этих исследованиях частота ПХЭ с микроядрами и количество фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  при действии НТО и ОСТ оставались на уровне контроля через 1 или 8 мес после начала эксперимента. Следует отметить несколько методических аспектов этой работы, которые, по-видимому, не позволили выявить эффект НТО и ОСТ в концентрации 1 МБк/л и выше. Отсутствие генотоксических эффектов в случае воздействия ОСТ можно объяснить различием использованных в работе соединений. В нашем исследовании мы использовали  $^3\text{H}$ -тимидин, который способен встраиваться в молекулу ДНК, формируя ее повреждения, а в работах [21, 22] – смесь тритированных аминокислот (глицин, аланин, пролин). Так, в экспериментах на культурах клеток было продемонстрировано, что эффект от воздействия тритированного тимидина был в среднем в два раза выше, чем от воздействия тритированных аминокислот [23]. В том же исследовании [21] имеется соответствие данным, полученным в настоящем эксперименте. При оценке цитогенетического эффекта в лимфоцитах периферической крови мышей показано достоверное увеличение уровня хромосомных aberrаций при действии НТО и ОСТ в 1,75 и 1,2 раза через месяц после начала воздействия. Через 8 мес частота хромосомных aberrаций при действии НТО определена на уровне контроля, тогда как ОСТ в концентрации 1 МБк/л повышал этот показатель приблизительно в 3 раза, т.е. тритий в форме ОСТ имеет более высокий генотоксический эффект по сравнению с НТО и  $\gamma$ -излучением [21]. В подтверждение более высокой токсичности ОСТ по сравнению с НТО можно отметить исследование *in vitro* [18], в котором индукция двунитевых разрывов ДНК при воздействии  $^3\text{H}$ -тимидина по сравнению с НТО была в 6,5 раз выше.

В монографии IARC 78 [19] обобщены сравнительные данные по распределению, удержанию и выведению трития в форме НТО и ОСТ ( $^3\text{H}$ -тимидин) в организме человека и животных. Во всех проведенных исследованиях показано, что содержание трития в организме после его однократного введения в форме ОСТ оказывается от 3 до 30 раз больше по сравнению с его введением в форме НТО, причем его количество распределено неравномерно. Например, в мозге, в печени и в стенке тонкой кишки определяется в 3, 15 и 17 раз больше трития, введенного в форме ОСТ по сравнению с НТО соответственно. В связи с этим указано, что потребление трития в форме ОСТ может увеличить радиационную нагрузку примерно в 2 раза.

Кроме того, в проведенном нами эксперименте было выявлено, что уровень фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  у интактных крыс на 31 сут вырос в ~5 раз, а уровень МЯ в ~2 раза

(относительно контроля на 10 сут). Полученный эффект может быть объяснен тем, что все крысы содержались в одном помещении, хотя и в разных клетках. Со временем, крысы, не потреблявшие тритированные соединения перорально, возможно, подвергались воздействию данных соединений, содержащихся в воздухе. Но для подтверждения этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

### Заключение

Таким образом, в проведенном исследовании определен генотоксический эффект НТО и  $^3\text{H}$ -тимидина с объем-

ной активностью 800 кБк/л микроядерным тестом в ПХЭ костного мозга и иммуноцитохимическим методом в спленоцитах крыс. Показано, что тритий в форме  $^3\text{H}$ -тимидина не имеет тенденции к равновесию на 31 сут, в отличие от НТО, и его генотоксический эффект увеличивается со временем поступления и на 31 сут значительно превышает эффект от НТО. Следовательно, необходимо учитывать временные параметры при сравнении эффектов НТО и  $^3\text{H}$ -тимидина. Таким образом, полученные данные указывают на необходимость использования дифференциального подхода при нормировании поступления соединений трития в организм.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fairlie I. The Hazards of Tritium-Visited // *Med Confl Surviv*. 2008. No. 24(4). P. 306-19. DOI: 10.1080/13623690802374239. PMID: 19065871.
2. Барчуков В.Г., Кочетков О.А., Клочков В.Н., Еремина Н.А., Максимов А.А. Распространение трития и его соединений в окружающей среде при нормальных условиях эксплуатации Калининской АЭС // *Мед. труда и пром. экол*. 2021. Т. 61, № 9. С. 594-600.
3. Balonov MI., Likhtarev IA., Moskalev Y. The Metabolism of  $^3\text{H}$  Compounds and Limits for Intakes by Workers // *Health Phys*. 1984. No. 47(5). P. 761-73. DOI: 10.1097/00004032-198411000-00008. PMID: 6511419.
4. HPA. Review of Risks from Tritium. RCE-4. Chilton: Health Protection Agency, 2007. [https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a7da092e5274a6b89a512ed/RCE-4\\_Advice\\_on\\_tritium.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a7da092e5274a6b89a512ed/RCE-4_Advice_on_tritium.pdf)
5. Kim SB., Baglan N, Davis PA. Current Understanding of Organically Bound Tritium (OBT) in the Environment // *J Environ Radioact*. 2013. No. 126. P. 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.07.011>
6. Harrison JD, Khurshed A, Lambert BE. Uncertainties in Dose Coefficients for Intakes of Tritiated Water and Organically Bound Forms of Tritium by Members of the Public // *Radiat Prot Dosimetry*. 2002. No. 98(3). P. 299-311. DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006722. PMID: 12018747.
7. Снигирёва Г.П., Хаймович Т.И., Богомазова А.Н. и др. Цитогенетическое обследование профессионалов-атомщиков, подвергавшихся химическому воздействию  $\beta$ -излучения трития // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2009. Т. 49, № 1. С. 60-66.
8. Нормы радиационной безопасности. НРБ-99/2009. СанПин 2.6.1.2523-09. Ионизирующее излучение, радиационная безопасность. Приложение 2а.
9. Gueguen Y, Priest ND, Dublineau I, Bannister L, Benderitter M, Durand C, et al. In Vivo Animal Studies Help Achieve International Consensus on Standards and Guidelines for Health Risk Estimates for Chronic Exposure to Low Levels of Tritium in Drinking Water // *Environ Mol Mutagen*. 2018. No. 59(7). P. 586-94. DOI: 10.1002/em.22200. PMID: 30151952.
10. 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. ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
11. Osipov A, Chigasova A, Yashkina E, Ignatov M, Fedotov Y, Molodtsova D, Vorobyeva N, Osipov AN. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts // *Cells*. 2023. Apr 21. No. 12(8). P. 1209. DOI: 10.3390/cells12081209. PMID: 37190118.
12. Schmid W. The Micronucleus Test // *Mutat Res*. 1975. No. 31. P. 9-15. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8. PMID: 48190.
13. OECD Guideline for the Testing Of Chemicals N474. 2016. Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test. Adopted: 29 July 2016 <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1619012690&id=id&accname=guest&checksum=86524B6E2974E8366F62DA2CFD91BDB7>
14. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом: Методические рекомендации. М.: Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации; 2001. 22 с.
15. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future // *Environ Mol Mutagen*. 1991. No. 18. P. 277-91. DOI: 10.1002/em.2850180414. PMID: 1748091.
16. Smith-Roe SL, Wyde ME, Stout MD, et al. Evaluation of the Genotoxicity of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Male and Female Rats and Mice Following Subchronic Exposure // *Environ Mol Mutagen*. 2020. No. 61(2). P. 276-290. DOI: 10.1002/em.22343. PMID: 31633839.
17. Alloni D, Cutaia C, Mariotti L, Friedland W, Ottolenghi A. Modeling Dose Deposition and DNA Damage Due to Low-Energy H3 Emitters // *Radiat Res*. 2014. No. 182. P. 322-30. DOI: 10.1667/RR13664.1.
18. Воробьева Н.Ю., Кочетков О.А., Пустовалова М.В. и др. Сравнительные исследования образования фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  в мезенхимных стволовых клетках человека при воздействии  $^3\text{H}$ -тимидина, оксида трития и рентгеновского излучения // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2018. №3. С. 205-8.
19. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (78) // *Ionizing Radiation. Part 2. Some Internally Deposited Radionuclides*. Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2001.
20. Priest ND, Blimkie MS, Wyatt H, Bugden M, Bannister LA, Gueguen Y, et al. Tritium ( $^3\text{H}$ ) Retention in Mice: Administered As HTO, DTO or as  $^3\text{H}$ -Labeled Amino-Acids // *Health Phys*. 2017. V. 112(5). P. 439-44. DOI: 10.1007/HP.0000000000000637. PMID: 28350697.
21. Roch-Lefevre S, Gregoire E, Martin-Bodiot C, Flegat M, Freneau A, Blimkie M, et al. Cytogenetic Damage Analysis in Mice Chronically Exposed to Low-Dose Internal Tritium Beta-Particle Radiation // *Oncotarget*. 2018. No. 9(44). P. 27397-411. DOI: 10.18632/oncotarget.25282. PMID: 29937993.
22. Rapport IRSN 2021-00206. Actualisation Des Connaissances Sur Les Effets Biologiques Du Tritium. Clamart, France: the Institute for Radiation Protection and Nuclear Safety (IRSN), 2021. 68 p. [https://www.irsln.fr/sites/default/files/documents/actualites\\_presse/actualites/20210506\\_IRSN-rapport-2021-00206-TRITIUM.pdf](https://www.irsln.fr/sites/default/files/documents/actualites_presse/actualites/20210506_IRSN-rapport-2021-00206-TRITIUM.pdf)
23. Роднева С.М., Осипов А.А., Гурьев Д.В., Цишнатти А.А., Федотов Ю.А., Яшкина Е.И., Воробьева Н.Ю., Максимов А.А., Кочетков О.А., Осипов А.Н. Сравнительные количественные исследования фокусов  $\gamma\text{H2AX}$ , образующихся в фибробластах лёгкого человека, инкубированных в средах, содержащих меченный тритием тимидин или аминокислоты // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2021. №3. С. 166-170.

## REFERENCES

1. Fairlie I. The Hazards of Tritium-Visited. *Med Confl Surviv.* 2008;Oct-Dec;24(4):306-19. DOI: 10.1080/13623690802374239. PMID: 19065871.
2. Barchukov VG, Kochetkov OA, Klochkov VN, Eremina NA, Maksimov AA. Distribution of Tritium and its Compounds in the Environment under Normal Conditions of Operating of Kalininskaya Nuclear Power Plant. *Med Truda i Prom Ekol.* = Occupational Medicine and Industrial Ecology. 2021;61(9):594-600. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2021-61-9-594-600> (In Russ.).
3. Balonov MI., Likhtarev IA., Moskalev Y. The Metabolism of  $^3\text{H}$  Compounds and Limits for Intakes by Workers. *Health Phys.* 1984;47(5):761-73. DOI: 10.1097/00004032-198411000-00008. PMID: 6511419.
4. HPA. Review of Risks from Tritium. RCE-4. Chilton: Health Protection Agency, 2007. [https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a7da092e5274a6b89a512ed/RCE-4\\_Advice\\_on\\_tritium.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a7da092e5274a6b89a512ed/RCE-4_Advice_on_tritium.pdf)
5. Kim SB., Baglan N, Davis PA. Current Understanding of Organically Bound Tritium (OBT) in the Environment. *J Environ Radioact.* 2013;126:83-91. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.07.011>
6. Harrison JD, Khursheed A, Lambert BE. Uncertainties in Dose Coefficients for Intakes of Tritiated Water and Organically Bound Forms of Tritium by Members of the Public. *Radiat Prot Dosimetry.* 2002;98(3):299-311. DOI: 0.1093/oxfordjournals.rpd.a006722. PMID: 12018747.
7. Snigireva GP, Khaimovich TI, Bogomazova AN, Gorbunova IN, Nagiba VI, Nikanorova EA, et al. Cytogenetic Examination of Nuclear Specialists Exposed to Chronic Beta-Radiation of Tritium. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biol. Radioecol. 2009;49(1):60-6 (In Russ.).
8. Radiation Safety Standards. NRB-99/2009. SanPin 2.6.1.2523-09. Ionizing radiation, Radiation Safety. Appendix 2a. (In Russ.).
9. Gueguen Y, Priest ND, Dublineau I, Bannister L, Benderitter M, Durand C, et al. Vivo Animal Studies Help Achieve International Consensus on Standards and Guidelines for Health Risk Estimates for Chronic Exposure to Low Levels of Tritium in Drinking Water. *Environ Mol Mutagen.* 2018;59(7):586-94. DOI: 10.1002/em.22200. PMID: 30151952.
10. 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. ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
11. Osipov A, Chigasova A, Yashkina E, Ignatov M, Fedotov Y, Molodtsova D, Vorobyeva N, Osipov AN. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. *Cells.* 2023;Apr 21;12(8):1209. DOI: 10.3390/cells12081209. PMID: 37190118.
12. Schmid W. The Micronucleus Test. *Mutat Res.* 1975;31:9-15. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8. PMID: 48190.
13. OECD Guideline for the Testing of Chemicals N474. 2016. Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test. Adopted: 29 July 2016 <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1619012690&id=id&accname=guest&checksum=86524B6E2974E8366F62DA2CFD91BDB7>
14. Guidelines. Assessment of the Mutagenic Activity of Environmental Factors in Cells of Various Mammalian Organs Using the Micronuclear Method. Moscow, Interdepartmental Scientific Council on Human Ecology and Environmental Hygiene of the Russian Federation Publ., 2001. 22 p. (In Russ.).
15. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ Mol Mutagen.* 1991;18:277-91. DOI: 10.1002/em.2850180414. PMID: 1748091.
16. Smith-Roe SL, Wyde ME, Stout MD, et al. Evaluation of the Genotoxicity of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Male and Female Rats and Mice Following Subchronic Exposure. *Environ Mol Mutagen.* 2020; 61(2):276-290. DOI: 10.1002/em.22343. PMID: 31633839.
17. Alloni D, Cutaia C, Mariotti L, Friedland W, Ottolenghi A. Modeling Dose Deposition and DNA Damage Due to Low-Energy H3 Emitters. *Radiat Res.* 2014;182:322-30. DOI: 10.1667/RR13664.1.
18. Vorobyeva NYu, Kochetkov OA, Pustovalova MV, Grekhova AK, Blokhina TM, Yashkina EI, et al. Comparative Study of  $\gamma\text{H2AX}$  Foci Formation in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to  $^3\text{H}$ -thymidine, Tritium Oxide and X-rays. *Kletochnyye Tekhnologii v Biologii i Meditsine* = Cell Technologies in Biology and Medicine. 2018;3:205-8 (In Russ.).
19. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (78) // Ionizing Radiation. Part 2. Some Internally Deposited Radionuclides. Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2001.
20. Priest ND, Blimkie MS, Wyatt H, Bugden M, Bannister LA, Gueguen Y, et al. Tritium ( $^3\text{H}$ ) Retention in Mice: Administered As HTO, DTO or as  $^3\text{H}$ -Labeled Amino-Acids. *Health Phys.* 2017;112(5):439-44. DOI: 10.1097/HP.0000000000000637. PMID: 28350697.
21. Roch-Lefevre S, Gregoire E, Martin-Bodiot C, Flegat M, Freneau A, Blimkie M, et al. Cytogenetic Damage Analysis in Mice Chronically Exposed to Low-Dose Internal Tritium Beta-Particle Radiation. *Oncotarget.* 2018;9(44):27397-411. DOI: 10.18632/oncotarget.25282. PMID: 29937993.
22. Rapport IRSN 2021-00206. Actualisation Des Connaissances Sur Les Effets Biologiques Du Tritium. Clamart, France, the Institute for Radiation Protection and Nuclear Safety (IRSN), 2021. 68 p. [https://www.irsn.fr/sites/default/files/documents/actualites\\_presse/actualites/20210506\\_IRSN-rapport-2021-00206-TRITIUM.pdf](https://www.irsn.fr/sites/default/files/documents/actualites_presse/actualites/20210506_IRSN-rapport-2021-00206-TRITIUM.pdf)
23. Rodneva SM, Osipov AA, Gur'ev DV, Tsishnatti AA, Fedotov YuA, Yashkina EI, Vorob'eva NYu, Maksimov AA, Kochetkov OA, Osipov AN. Comparative Investigations of the  $\gamma\text{H2ax}$  Foci Forming in Human Lung Fibroblasts Incubated in Media Containing Tritium-Labeled Thymidine or Amino Acids. *Kletochnyye Tekhnologii v Biologii i Meditsine* = Cell Technologies in Biology and Medicine. 2021;3:166-70 (In Russ.). DOI: 10.47056/1814-3490-2021-3-166-170.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания, тема НИР «Трэк-1» рег. № НИОКТР АААА-А19-119031190033-1.

**Участие авторов.** Роднева С.М., Сычева Л.П., Максимов А.А., Жорова Е.С., Гурьев Д.В. – подготовка текста статьи, анализ и интерпретация данных, проведение экспериментов, сбор и анализ литературного материала; Жорова Е.С., Гурьев Д.В. – разработка концепции и дизайна исследования, осуществление внутреннего аудита; Роднева С.М., Сычева Л.П., Максимов А.А., Жорова Е.С., Цишнатти А.А., Тищенко Г.С., Федотов Ю.А., Трубенкова Т.М., Яшкина Е.И., Гурьев Д.В. – проведение экспериментов и статистическая обработка данных; Роднева С.М., Сычева Л.П., Гурьев Д.В., Максимов А.А., Барчуков В.Г. – научное редактирование текста, проверка критически важного интеллектуального содержания; Гурьев Д.В. – утверждение окончательного варианта рукописи.

**Поступила:** 20.05.2024. **Принята к публикации:** 25.06.2024.

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

**Financing.** The research was carried out within the framework of the state task, the research topic is «Track-1» reg. # АААА-А19-119031190033-1.

**Contribution.** Rodneva S.M., Sycheva L.P., Maksimov A.A., Zhorova E.S., Guryev D.V. – preparation of the text of the article, analysis and interpretation of data, conducting experiments, collection and analysis of literary material; Zhorova E.S., Guryev D.V. – development of the concept and design of the study, internal audit; Rodneva S.M., Sycheva L.P., Maksimov A.A., Zhorova E.S., Tsishnatti A.A., Tishchenko G.S., Fedotov Yu.A., Trubchenkova T.M. a., Yashkina E.I., Guryev D.V. – conducting experiments and statistical data processing; Rodneva S.M., Sycheva L.P., Guryev D.V., Maksimov A.A., Barchukov V.G. – scientific editing of the text, verification of critically important intellectual content; Guryev D.V. – approval of the final version of the manuscript.

**Article received:** 20.05.2024. **Accepted for publication:** 25.06.2024.