

Е.Ю. Москалева, А.Н. Романцова, Ю.П. Семочкина, А.В. Родина, И.В. Чешигин, А.С. Дегтярев, А.С. Жирник
**АНАЛИЗ ПОЯВЛЕНИЯ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ
И АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
ПОСЛЕ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ
БЫСТРЫМИ НЕЙТРОНАМИ В НИЗКИХ ДОЗАХ**

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактное лицо: Елизавета Юрьевна Москалева: moskalevaey@mail.ru; Moskaleva_EY@nrcki.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Анализ уровня цитогенетических повреждений и активности пролиферации клеток костного мозга у мышей линии C57BL/6 при пролонгированном облучении животных быстрыми нейтронами в диапазоне низких доз 10 – 500 мГр.

Материал и методы: В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 7–8 и 16 нед. Облучение проводили на установке ОР-М в поле быстрых нейтронов и гамма-квантов с использованием пяти $\text{Pu}(\alpha, n)\text{Be}$ радионуклидных источников с высоким значением выхода быстрых нейтронов при суммарной мощности дозы от нейтронов и сопутствующих гамма-квантов 2,13 мГр/ч. В клетках костного мозга контрольных и облученных мышей анализировали частоту полихроматофильных (ПХЭ) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов с микроядрами (МЯ) и соотношение ПХЭ и НХЭ при световой микроскопии. Активность пролиферации клеток костного мозга оценивали по количеству Ki-67⁺-клеток. Параметры клеточного цикла и уровень апоптоза исследовали после окрашивания ДНК красителем DAPI с помощью проточной цитометрии. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы Origin.

Результаты: Обнаружено, что пролонгированное облучение мышей в дозах от 10 до 500 мГр через 24 ч приводило к статистически значимому повышению частоты ПХЭ с МЯ при всех исследованных дозах. Зависимости этого показателя от дозы в исследованном диапазоне не наблюдали. Повышение частоты ПХЭ с МЯ при дозе 500 мГр сохранялось, по крайней мере, до 72 ч. Достоверное повышение частоты НХЭ с МЯ через 24 ч после облучения обнаружено только при дозе 500 мГр, и оно сохранялось до 48 ч. При этой дозе обнаружено также снижение количества ядросодержащих клеток в костном мозге через 24 – 72 ч после воздействия, снижение через 24 ч после облучения мышей количества Ki-67⁺-клеток, блок клеточного цикла в фазе G₂/M и снижение клеток в фазе G₀/G₁, но уже через 48 ч нарушения в клеточном цикле отсутствовали.

Заключение: Показано, что для однократного общего пролонгированного облучения мышей в низких дозах (10 – 500 мГр) при анализе частоты ПХЭ с МЯ в костном мозге регистрируются цитогенетические повреждения, что свидетельствует о генетической опасности действия даже таких низких уровней облучения быстрыми нейтронами. Снижение количества Ki-67⁺-клеток и блок клеточного цикла в фазе G₂/M обнаружено только после облучения мышей в дозе 500 мГр и только через 24 ч после воздействия, а количество ядросодержащих клеток в костном мозге при этой дозе было снижено до 72 ч.

Ключевые слова: микроядра, костный мозг, клеточный цикл, пролиферация клеток, Ki-67, быстрые нейтроны, пролонгированное облучение, низкие дозы, мыши

Для цитирования: Москалева Е.Ю., Романцова А.Н., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чешигин И.В., Дегтярев А.С., Жирник А.С. 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

Введение

В природе практически единственным естественным источником нейтронов является космическое излучение, в основном, поток протонов, под действием которых в атмосфере образуются нейтроны. Они вносят определенный вклад в эффективную дозу облучения населения. Облучению нейтронами в процессе профессиональной деятельности подвергаются сотрудники, занятые в атомной промышленности, хотя в профессиональном облучении в этой сфере доза от нейтронов составляет лишь небольшую часть от общей получаемой эффективной дозы. В медицинских учреждениях облучение низкими дозами вторичных нейтронов во многом связано с использованием пучков фотонов высоких энергий, образующихся при работе ускорителей электронов и протонов. Средняя индивидуальная эффективная доза нейтронов за всю жизнь оценивается как 6 мЗв для населения на уровне земли, 30 мЗв для экипажей самолетов, но она может быть значительно выше для пациентов, получающих лучевую терапию пучками фотонов, протонов и ионов [1], а также лучевую терапию с использованием нейтронов.

Действие нейтронов характеризуется высоким коэффициентом ОБЭ. Так, показано, что по критериям снижения митотического индекса и образования аберраций хромосом в клетках костного мозга после общего облучения мышей F1(CBAxС57BL/6) быстрыми нейтронами с энергией 1,5 МэВ в дозах 0,25–2,5 Гр при мощности дозы 23,9 сГр/с, ОБЭ быстрых нейтронов через 24 и 72 ч после облучения составляла от 4,1 ± 0,1 до 7,3 ± 0,1 [2].

ОБЭ нейтронов деления с энергией 1,3 МэВ при мощности дозы 7 мГр/мин в дозах 0,2 – 0,6 Гр по отношению к рентгеновскому облучению для индукции микроядер (МЯ) в ретикулоцитах периферической крови мышей ICR была оценена в 1,9±0,3, в то время как для индукции апоптоза лимфоцитов в тимусе значение ОБЭ было существенно выше и составило 4,6±0,5 [3].

Уровень повреждающего действия может зависеть не только от качества излучения, что определяется величиной ЛПЭ, но и от мощности дозы воздействия. Так, при оценке повреждения клеток по критерию образования двунитевых разрывов (ДР) ДНК, которые регистрировали по количеству фокусов γH2AX, показана значительная разница в их уровне после облучения лимфоцитов периферической крови человека быстрыми нейтронами с энергией 29,8 МэВ при относительно низкой (0,015 Гр/мин) и высокой (0,400 Гр/мин) мощности дозы в дозах от 0,125 до 2 Гр. Количество и размер фокусов γH2AX были более высокими после облучения с высокой мощностью дозы, а их репарация – более медленной [4]. Аналогичные результаты были получены при исследовании уровня повреждения ДНК лимфоцитов и образования МЯ в этих клетках при рентгеновском облучении мышей C57BL/6 в дозах 1–4,45 Гр при высокой (1,03 Гр/мин) и низкой (0,31 сГр/мин) мощности дозы [5] и по уровню фокусов гистона γH2AX, т. е. ДР ДНК, и исследовании фокусов фосфорилированной формы серин/треониновой протеинкиназы, мутантной при атаксии-телеангиэктазии (pATM) при гамма-облучении МСК человека в дозах 30–300 мГр и мощности

дозы 0,1 и 30 мГр/мин [6]. Однако вопрос о возможности появления генетических нарушений при облучении животных быстрыми нейтронами в диапазоне малых и низких доз при низкой мощности дозы излучения практически не изучен.

В связи с этим целью настоящей работы явился анализ уровня цитогенетических повреждений и активности пролиферации клеток костного мозга у мышей линии C57BL/6 при пролонгированном облучении животных быстрыми нейтронами в дозах от 10 до 500 мГр при мощности дозы 2,13 мГр/ч (35,5 мкГр/мин).

В качестве маркера генетических повреждений использована частота появления полихроматофильных (ПХЭ, ретикулоциты) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов с МЯ в костном мозге мыши. МЯ представляют собой небольшие ДНК-содержащие тельца в цитоплазме клеток, которые образуются в результате повреждения хромосом при действии ионизирующего излучения или химических агентов. Фрагменты поврежденных хромосом отстают от веретена деления на стадии анафазы. МЯ включают ацентрические фрагменты хромосом или целые хромосомы. Появление МЯ зависит степени повреждения ДНК клетки и активности репарации ДР ДНК. Радиационно-индуцированные хромосомные aberrации, регистрируемые как МЯ, в значительной мере являются следствием сохранения нерепарированных или репарированных с ошибками ДР ДНК при их репарации по пути негомлогичного соединения концов.

Материал и методы

Лабораторные животные

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (получены из питомника «Столбовая») в возрасте 7–8 и 16 нед с массой тела 18–20 г. Перед проведением экспериментов животные проходили адаптацию/акклиматизацию в карантине в течение 14 сут, после окончания которого их распределяли на экспериментальные группы путём рандомизации с исключением больных и ослабленных животных. Мышей содержали в стандартных условиях вивария, по 5 особей в клетке, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977) и требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» по вопросам биомедицинских исследований.

Пролонгированное облучение мышей при действии нейтронного и гамма-излучения

Облучение мышей проводили на установке ОР-М НИЦ «Курчатовский институт» в стационарном поле быстрых нейтронов и сопутствующих гамма-квантов. Поле было сформировано в облучательном объеме установки (тоннель 2×2×25 м) с использованием пяти Pu(α ,n)Be радионуклидных источников с высоким значением выхода быстрых нейтронов. Источники были размещены в пространстве таким образом, чтобы в области размещения клеток с животными поле нейтронов было близким к равномерному. Энергетические распределения быстрых нейтронов и гамма-квантов, испускаемых каждым источником, были предварительно измерены с неопределенностью ~10–15 %.

При длительных облучениях (до 10 суток) был обеспечен циклический световой режим (день/ночь) и контроль температуры. Осуществлялось также видеонаблюдение за животными с помощью видеокамеры Vstarcam C8838WIP (Shenzhen Vstarcam Technology Co., Ltd, KHP) с периодической фиксацией изображения.

Дозиметрические измерения

При исследовании энергетических и пространственных распределений плотности потока излучений в поле пяти Pu(α ,n)Be радионуклидных источников с определением мощности поглощённой дозы в требуемых точках стационарного радиационного поля измерения выполнялись с использованием цифрового спектрометра-дозиметра быстрых нейтронов и гамма-квантов SDMF-1206PRO.DB(DT) (ООО «Центр АЦП», Россия). Диапазон регистрируемых энергий быстрых нейтронов составлял от 0,1 до 11 МэВ, а гамма-квантов – от 0,1 до 6 МэВ. Средняя энергия нейтронов составила 3,5 МэВ.

Для измерения интегральных по энергии плотностей потока быстрых нейтронов с энергиями выше 2,5, 5,0 и 7,5 МэВ использовались также пороговые активационные детекторы быстрых нейтронов на основе реакций $^{31}\text{P}(n,p)^{31}\text{Si}$, $^{27}\text{Al}(n,p)^{27}\text{Mg}$, $^{27}\text{Al}(n,\alpha)^{24}\text{Na}$ и тепловых нейтронов на основе реакции $^{164}\text{Dy}(n,\gamma)^{165}\text{Dy}$. Все используемые детекторы являются составной частью радиометрического комплекса установки ОР-М НИЦ «Курчатовский институт».

На рис. 1 представлены в относительных единицах энергетические распределения обоих видов излучения Pu- α -Be источников, измеренные в сформированном поле излучения.

В контрольной точке, соответствующей центру клетки на уровне размещения животных, суммарная мощность поглощенной дозы быстрых нейтронов и гамма-квантов с энергией выше 0,1 МэВ составила 2,13 мГр/ч (35,5 мкГр/мин). Причем на нейтроны приходилось три четверти мощности поглощенной дозы – 1,57 мГр/ч. Величина поглощенной дозы определялась продолжительностью облучения, которая варьировала от 2 ч до 10 сут. В последующих разделах при оценке биологических эффектов приводится суммарная поглощенная доза, в которой на нейтроны приходится 75 % (далее в тексте как «облучение быстрыми нейтронами»).

Расчетные исследования и сопоставление с экспериментом позволили сделать заключение, что часть излучения, рассеянного в стенах, конструкциях и материалах

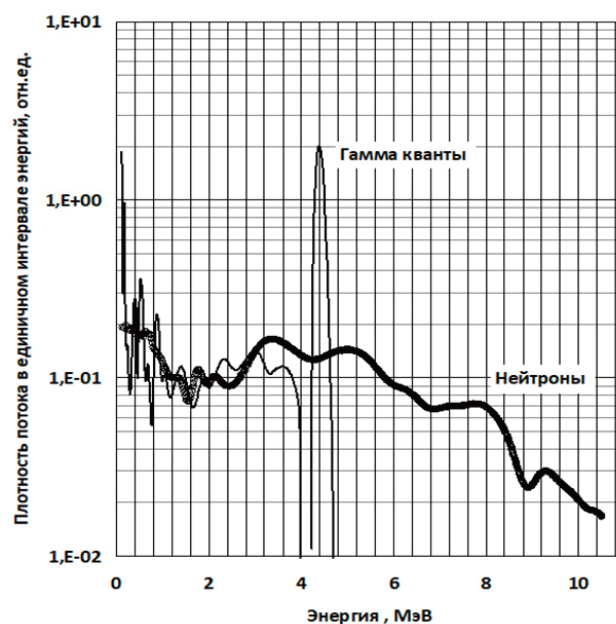


Рис. 1. Нормированные спектры быстрых нейтронов и сопутствующих гамма-квантов в стационарном радиационном поле, сформированном пятью Pu(α ,n)Be радионуклидными источниками

Fig. 1. Normalized spectra of fast neutrons and accompanying gamma quanta in a stationary radiation field formed by five Pu (α , n) Be radionuclide sources

клетки, давало вклад в поглощенную дозу в указанном диапазоне энергий около 5 %.

Вклад медленных нейтронов (с энергией менее 0,1 МэВ), образующихся в результате рассеяния в стенах и конструкциях, оценен на основе результатов измерений потока излучений в окружающем клетки пространстве объемом более 10 м^3 . Их вклад в мощность поглощенной дозы в месте пребывания мышей в клетках не превышал одного процента. Вклад сопутствующего гамма-излучения – рассеянного и образовавшегося в стенах за счет неупругого рассеяния и радиационного захвата нейтронов – в мощность поглощенной дозы также был оценен как незначительный.

Анализ количества микроядер в клетках костного мозга мышей

Контрольных и облученных животных умерщвляли через 24, 48 и 72 ч после облучения с помощью цервикальной дислокации. Костный мозг вымывали из каждой большой берцовой кости мыши 0,5 мл фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) в пробирку на 1,5 мл. Клетки собирали при центрифугировании при 800g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставляя ~ 20 мкл сыворотки, суспендировали в ней клетки и готовили мазки костного мозга на предметных стеклах. Фиксацию клеток проводили с использованием раствора метанола, окрашивание препаратов – с использованием азура и эозина по методу [7] с использованием набора готовых красителей «Лейкодиф 200» (Erbalchem, Чешская Республика). При анализе МЯ в клетках костного мозга у каждой мыши подсчитывали по 2000 ПХЭ и НХЭ, подсчитывали количество этих клеток с МЯ, рассчитывали частоту ПХЭ и НХЭ с МЯ и процентное соотношение ПХЭ и НХЭ в препаратах.

Анализ содержания Ki-67⁺-клеток, клеточного цикла и уровня апоптоза в клетках костного мозга мышей

Исследование проводили с помощью проточной цитометрии. Клетки костного мозга фиксировали и пермеабелизовали в 70 % этаноле при +4 °С в течение часа, после чего отмывали от этанола в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) трижды. Для блокировки неспецифического связывания образцы инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) при комнатной температуре 30 мин. Иммуноцитохимическое окрашивание белка Ki67 проводили в блокирующем буфере с использованием моноклональных антител к мышиному белку Ki67, меченных Alexa Fluor 647 (Biolegend, США), в концентрации 0,12 мкг/мл (разведение 1:400) с добавлением DAPI в концентрации 1 мкг/мл для окрашивания ДНК в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После окрашивания образцы отмывали в ФСБ трижды и анализировали на проточном цитометре-сортере BD FACSAria Fusion (BD Bioscience, США). Долю апоптотических клеток оценивали как долю гиподиплоидных клеток.

Таблица 1

Зависимость частоты ПХЭ и НХЭ с МЯ в костном мозге мышей через 24 ч после окончания облучения
Dependence of the frequency of PCE and NCE with MN in the bone marrow of mice 24 h after the end of the exposure

Доза облучения, мГр	Длительность облучения	Количество клеток, %		Частота клеток с микроядрами, %	
		ПХЭ	НХЭ	ПХЭ	НХЭ
0	0	50,7±2,1	49,3±2,1	4,5±0,4	3,5±0,6
10	4 ч 41 мин	41,9±2,5	58,1±2,5	7,4±0,8*	4,4±0,7
50	23 ч 28 мин	37,9±4,1*	62,1±4,1*	6,8±0,6*	2,8±0,6
100	1 сут 23 ч	52,3±3,4	47,7±3,4	6,7±0,8*	2,0±0,6
500	9 сут 19 ч	46,1±3,1	53,9±3,2	8,6±0,9*	6,2±0,8*

Примечание: * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.

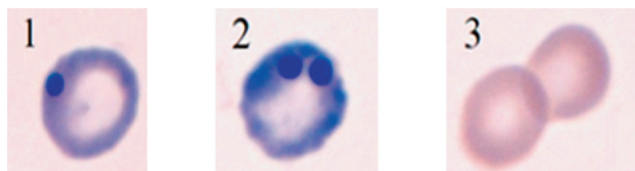


Рис. 2. Микроядра в ПХЭ в костном мозге через 24 ч после однократного пролонгированного общего облучения мышей быстрыми нейтронами в дозе 10 мГр. 1 – ПХЭ с одним МЯ; 2 – ПХЭ с двумя МЯ; 3 – НХЭ без МЯ
Fig. 2. Micronuclei in PCE in the bone marrow 24 h after a single prolonged general irradiation of mice with fast neutrons at a dose of 10 mGy. 1 – PCE with one MN; 2 – PCE with two MNs; 3 – NCE without MN

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы Origin. Результаты представлены в виде средних значений ± погрешность среднего. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для выявления цитогенетических нарушений при однократном общем пролонгированном облучении мышей при действии нейтронного излучения в малых и низких дозах использованы результаты анализа количества МЯ в клетках костного мозга контрольных и облученных мышей через 24 ч после окончания облучения, как описано в разделе «Материалы и методы». Примеры регистрации МЯ в ПХЭ мышей показаны на рис. 2.

В разных сериях экспериментов количество МЯ в эритроцитах костного мозга контрольных (ложно облученных) мышей линии C57BL/6 составляло от $1,8 \pm 0,5$ для мышей в возрасте 2–2,5 мес до $4,5 \pm 0,4$ % для животных в возрасте 4–4,5 мес при анализе ПХЭ и от $0,5 \pm 0,2$ до $4,3 \pm 1,0$ % для НХЭ соответственно. Поэтому во всех экспериментах клетки костного мозга получали одновременно у контрольных и облученных животных соответствующих групп.

Результаты, полученные при исследовании костного мозга контрольных и облученных нейтронами в дозах от 10 до 500 мГр мышей, представлены в табл. 1.

Показано, что пролонгированное облучение мышей быстрыми нейтронами при низкой мощности дозы в дозах от 10 до 500 мГр приводило к статистически значимому повышению частоты появления ПХЭ с МЯ при всех указанных дозах. Зависимости частоты ПХЭ с МЯ от дозы в диапазоне доз от 10 до 100 мГр не наблюдали. Статистически значимое повышение частоты НХЭ с МЯ в костном мозге обнаружено только при дозе 500 мГр.

Следует отметить, что при пролонгированном облучении мышей нейтронами при более высокой мощности дозы авторы разных работ наблюдали пропорциональное дозе облучения увеличение частоты МЯ в ретикулоцитах в костном мозге и периферической крови: при мощности дозы 29,2–41,7 мГр/ч и дозах 115–315 мГр [8]; при мощности дозы 420 мГр/ч и дозах 200–600 мГр [3], при мощности дозы 7,18 мГр/ч и дозах 15–50,6 мГр [9]. Однако в

нашем исследовании мощность дозы была в 3,4–197 раз ниже, чем в указанных работах, и составляла только 2,13 мГр/ч. Соответственно различалась продолжительность облучения для достижения необходимой величины поглощенной дозы, что, по-видимому, способствовало активации процессов адаптации и репарации ДНК и восстановления части повреждений ДНК «под лучом», что и приводило к отсутствию дозовой зависимости в диапазоне малых доз в этих условиях. Аналогичное отсутствие зависимости повышения частоты МЯ в ПХЭ костного мозга от дозы было обнаружено при хроническом гамма-облучении мышей при очень низкой мощности дозы – 0,15 мГр/ч – в дозах 100 – 640 мГр [10], что подтверждает наше предположение о роли очень низкой мощности дозы в формировании отсутствия зависимости повышения частоты ПХЭ с МЯ в костном мозге от дозы при облучении животных нейтронами в диапазоне низких доз от 10 до 100 мГр.

Полученные результаты по индукции цитогенетических повреждений при облучении мышей быстрыми нейтронами в диапазоне малых доз коррелируют с данными о высокой канцерогенной активности нейтронного излучения, обобщенными в монографии [11]. В этой публикации приведены сведения о более высокой эффективности нейтронов по индукции опухолей у крыс по сравнению с γ -излучением при дозе 20 мГр и о канцерогенном действии нейтронов при облучении в дозах порядка 100 мГр (1,5 МэВ) и увеличении частоты опухолей яичников, легкого и гардеровых желез при дозе нейтронов 500 мГр (0,18 – 1 МэВ). При более высоких дозах нейтронов (2,3–4,4 Гр) обнаружена высокая частота появления опухолей и у обезьян. Сопоставление с литературными данными полученными нами данных о цитогенетических нарушениях в клетках костного мозга, оцениваемых по повышению частоты ПХЭ с МЯ, при малых дозах облучения нейтронами с высокой частотой развития опухолей свидетельствует о потенциальной биологической опасности даже таких низких уровней нейтронного излучения.

Известно, что при рентгеновском и γ -облучении мышей в малых дозах развиваются защитные реакции, в том числе может развиваться адаптивный эффект, который заключается в развитии устойчивости к последующему облучению животных в более высоких дозах. В частности показано, что однократные низкие дозы гамма-излучения 0,1 и 0,5 Гр вызывают цитогенетический адаптивный ответ (частота МЯ в ПХЭ) в клетках костного мозга мыши, который сохраняется до 12 мес после облучения. Способность вызывать адаптивный ответ не зависит от возраста животных на момент адаптивного облучения; однократное γ -облучение в малых дозах снижает частоту ПХЭ с МЯ до уровня ниже спонтанного уровня в конце жизни животных в возрасте 20 мес [12], хотя в некоторых исследованиях показано более ограниченное развитие адаптивного эффекта [13]. Однако при хроническом облучении мышей нейтронами со средней энергией 20 МэВ при мощности дозы около 1 сГр/сут адаптивный эффект при последующем облучении мышей γ -излучением в дозе 1,5 Гр, в отличие от предварительного γ -облучения мышей в малых дозах 10 и 50 мГр, отсутствовал. Кроме того, у мышей-самцов 1-го поколения от спаривания облученных самок через 2 недели после облучения и необлученных самок адаптивный эффект на гамма-облучение в малой дозе 10 сГр также отсутствовал, в отличие от мышей 1-го поколения после спаривания с необлученными самцами [8]. Отсутствие адаптивного эффекта при облучении нейтронами в низких дозах также свидетельствует о повреждающем действии таких доз нейтронов.

Соотношение между ПХЭ и НХЭ после облучения мышей в указанных дозах (табл. 1) было практически постоянным, за исключением снижения количества ПХЭ при дозе 50 мГр. Наблюдаемое при этой дозе перераспределение ПХЭ и НХЭ связано, скорее всего, со стимуляцией пролиферации и миграции в кровь клеток костного мозга. Такая стимуляция образования кроветворных клеток-предшественников, в том числе кроветворных стволовых клеток (c-kit⁺-клеток), гранулоцитарных, гранулоцитарно-макрофагальных и эритроидных клеток-предшественников, была обнаружена при облучении мышей линии Kunming рентгеновским излучением с мощностью дозы 75 мГр/мин в дозах 50 и 75 мГр, но не 25 или 100 мГр, что было обусловлено повышением уровня секреции цитокинов, стимулирующих пролиферацию соответствующих клеток при таком облучении [14].

Динамику изменения частоты МЯ в ПХЭ и НХЭ исследовали после облучения мышей в дозах 10 и 500 мГр. Полученные результаты представлены на рис. 3а,б. Показано, что через 24 ч после облучения мышей нейтронами в дозах 10 и 500 мГр частота ПХЭ с МЯ возрастала с $1,8 \pm 0,3$ % в контроле до $4,1 \pm 0,4$ и $4,8 \pm 0,4$ % соответственно. Через 48 и 72 ч после воздействия в дозе 10 мГр количество МЯ в этих клетках статистически значимо от контроля не отличалось. В то же время после облучения мышей в дозе 500 мГр частота ПХЭ с МЯ через 48 и 72 ч снижалась на 20 %, но достоверно превышала таковую в костном мозге ложно облученных мышей (рис. 3а).

Частота НХЭ с МЯ при дозе 10 мГр не отличалась от контроля во все сроки исследования, а при дозе 500 мГр она статистически значимо превышала контрольный уровень через 24 и 48 ч после облучения мышей (рис. 3б).

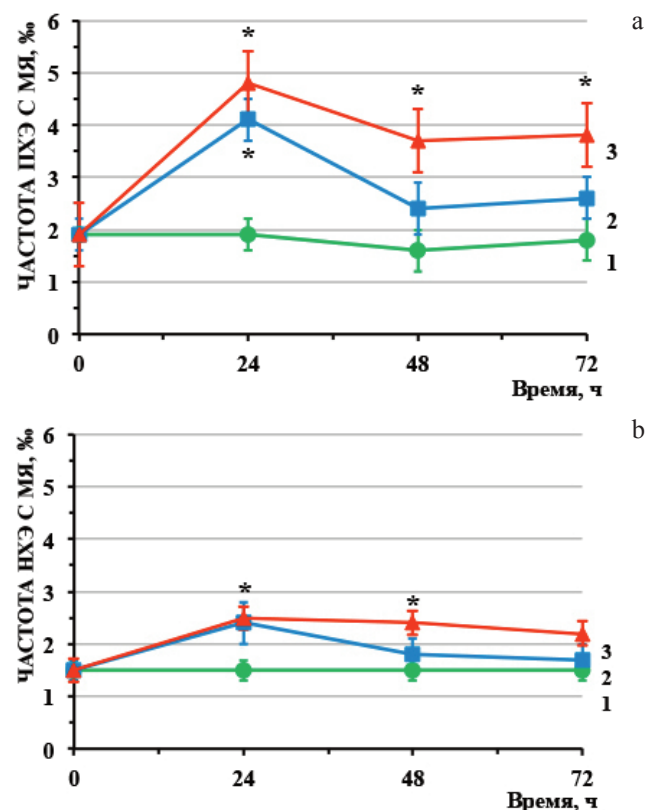


Рис. 3. Динамика изменения частоты ПХЭ (а) и НХЭ (б) с МЯ в костном мозге контрольных мышей линии C57BL/6 (1) и после однократного пролонгированного общего облучения быстрыми нейтронами в дозах 10 (2) и 500 мГр (3)
Fig. 3. Dynamics of changes in the frequency of (a) PCE and (b) NCE with MN in the bone marrow of control C57BL/6 mice (1) and after a single prolonged general irradiation with fast neutrons at doses of 10 (2) and 500 mGy (3)

Таблица 2

Влияние облучения мышей линии C57BL/6 быстрыми нейтронами в низких дозах на количество Ki67⁺-клеток в костном мозге мышей в динамике после облучения
Effect of irradiation of C57BL/6 mice with fast neutrons at low doses on the number of Ki67⁺ cells in the bone marrow of mice in dynamics after exposure

Доза облучения, мГр	Количество Ki67 ⁺ -клеток, %		
	Время после окончания облучения, ч		
	24	48	72
0	42,0 ± 0,5	38,7 ± 0,8	32,1 ± 2,4
10	40,9 ± 1,9	38,1 ± 0,6	35,1 ± 2,0
500	31,1 ± 2,5*	37,7 ± 1,2	37,2 ± 1,9

Примечание: * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.

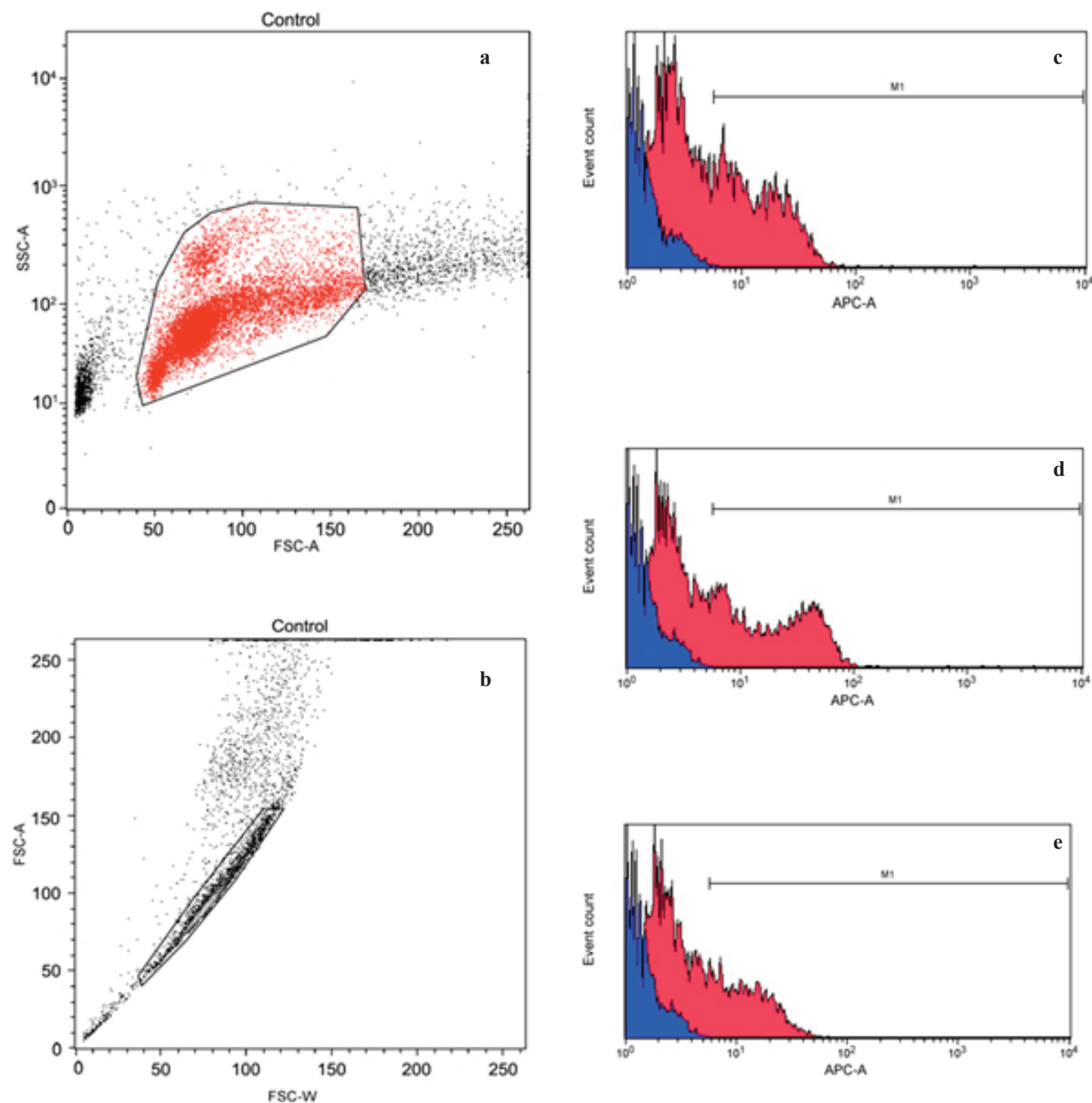


Рис. 4. Идентификация Ki-67⁺-клеток в суспензии клеток костного мозга.

а – прямое/боковое светорассеяние клеток; б – выбор для анализа популяции, не содержащей агрегатов клеток; с-е – примеры определения количества Ki-67⁺-клеток в костном мозге контрольных (с) и облученных в дозах 10 мГр (д) и 500 мГр (е) мышей

Fig. 4. Identification of Ki-67⁺ cells in bone marrow cell suspension. а – forward / lateral light scattering of cells; б – selection for analysis of a population that does not contain cell aggregates; с-е – examples of determining the number of Ki-67⁺ cells in the bone marrow of control (с) and irradiated at doses of 10 mGy (д) and 500 mGy (е)

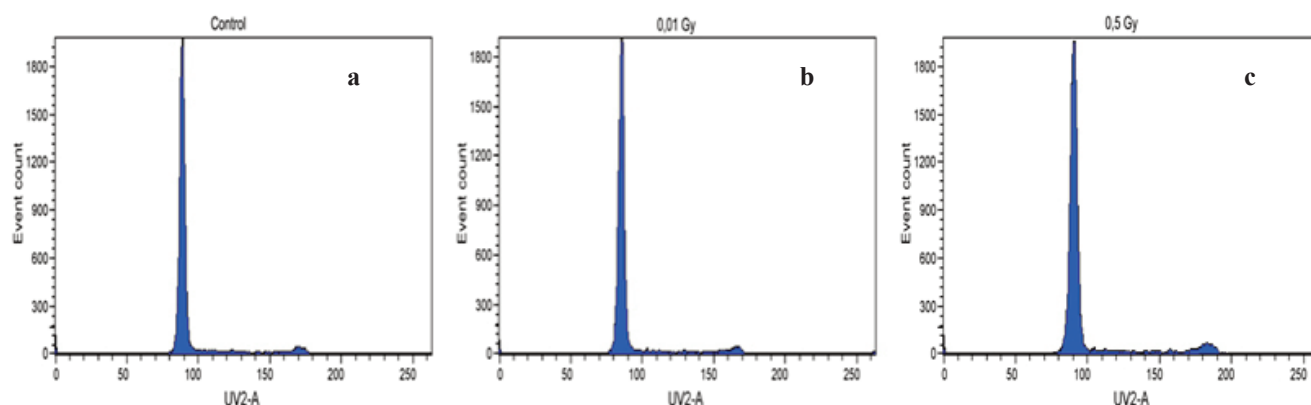


Рис. 5. Гистограммы распределения клеток костного мозга по фазам клеточного цикла у контрольных мышей (а) и у мышей, облученных быстрыми нейтронами в дозах 10 (b) и 500 (c) мГр через 24 ч после воздействия. Данные проточной цитометрии
Fig. 5. Histograms of the distribution of bone marrow cells by phases of the cell cycle in control mice (a) and in mice irradiated with fast neutrons at doses of 10 (b) and 500 (c) mGy 24 h after exposure. Flow cytometry data

Таблица 3

Количество ядросодержащих клеток в костном мозге, распределение клеток по фазам клеточного цикла и уровень апоптоза в динамике после облучения мышей линии C57BL/6 быстрыми нейтронами в низких дозах
The number of nucleated cells in the bone marrow, the distribution of cells over the phases of the cell cycle and the level of apoptosis in dynamics after irradiation of C57BL/6 mice with fast neutrons at low doses

Время после облучения, ч	Доза, мГр	Количество клеток, млн/бедро	Апоптоз, %	Количество клеток в фазе клеточного цикла, %		
				G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24	0	14,2 ± 0,7	2,7 ± 0,6	85,5 ± 0,5	11,0 ± 0,1	3,5 ± 0,5
	10	11,6 ± 0,6*	3,4 ± 0,7	86,9 ± 0,8	9,7 ± 0,8	3,5 ± 0,4
	500	10,9 ± 0,3*	3,3 ± 0,7	82,7 ± 0,9*	12,1 ± 1,0	6,0 ± 0,7*
48	0	14,2 ± 0,7	2,4 ± 0,5	83,6 ± 0,7	12,4 ± 0,3	3,9 ± 0,3
	10	12,7 ± 1,1	3,3 ± 0,5	83,7 ± 0,4	12,5 ± 0,6	3,8 ± 0,2
	500	10,5 ± 0,5*	2,8 ± 0,6	82,9 ± 1,5	14,1 ± 1,2	3,8 ± 0,2
72	0	14,2 ± 0,7	2,7 ± 0,2	84,2 ± 0,4	12,2 ± 0,6	3,6 ± 0,2
	10	12,4 ± 1,5	2,3 ± 0,5	82,1 ± 0,7	13,9 ± 1,0	4,0 ± 0,3
	500	9,1 ± 0,7*	0,5 ± 0,1*	83,4 ± 1,1	13,0 ± 0,8	3,8 ± 0,5

Примечание: * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, через 24 ч после пролонгированного облучения мышей быстрыми нейтронами в дозах 10 и 500 мГр в костном мозге обнаружено повышение частоты ПХЭ с МЯ, которое при дозе 500 мГр было длительным и сохранялось, по крайней мере, до 72 ч. Достоверное повышение частоты НХЭ с МЯ обнаружено только после облучения мышей в дозе 500 мГр, которое оставалось повышенным до 48 ч.

Для исследования влияния облучения мышей быстрыми нейтронами на активность пролиферации клеток костного мозга проведен анализ количества Ki67⁺-клеток методом проточной цитометрии, что позволило оценить долю клеток, находящихся в клеточном цикле в G₁, S и G₂/M фазах. Анализ количества клеток в отдельных фазах цикла проводили после окрашивания ДНК красителем DAPI. Одновременно исследовали количество ядросодержащих клеток в костном мозге.

На рис. 4 показан пример определения количества Ki67⁺-клеток с помощью проточной цитометрии, а в табл. 2 приведены данные по изменению количества Ki67⁺-клеток в костном мозге мышей в динамике после облучения животных в дозах 10 и 500 мГр. Показано, что статистически значимое снижение количества Ki67⁺-клеток имело место только при дозе 500 мГр (табл. 2).

При исследовании параметров клеточного цикла (рис. 5, табл. 3) после облучения мышей в дозе 10 мГр ни в одном из сроков исследования нарушения клеточного цикла обнаружены не были. После облучения в дозе 500 мГр обнаружено накопление клеток в фазе G₂/M, что сопровождалось снижением доли клеток в фазе G₀/G₁ (рис. 5, табл. 3). Но уже через 48 ч блок клеточного цикла отсутствовал, и нарушений в клеточном цикле не наблюдалось.

При анализе количества ядросодержащих клеток в костном мозге показано, что во все сроки исследования – через 24, 48 и 72 ч после облучения – имело место статистически значимое снижение клеточности костного мозга только после облучения мышей в дозе 500 мГр. После облучения животных в дозе 10 мГр статистически значимые различия обнаружены только через 24 ч (табл. 3).

Увеличения уровня апоптоза клеток костного мозга у мышей, облученных быстрыми нейтронами в указанных дозах, через 24 и 48 ч после воздействия не регистрировали, но через 72 ч после облучения в дозе 500 мГр он был достоверно снижен (табл. 3). Такое снижение уровня апоптоза было бы возможно при усиленной гибели части клеток в период между 48 и 72 ч. Действительно, в этот период продолжалось снижение количества ядросодержащих клеток в костном мозге мышей, облученных в дозе 500 мГр (табл. 3). Длительное – по крайней мере, до 72 ч – сохранение в костном мозге повышенной частоты ПХЭ с МЯ при этой дозе свидетельствует о возможности сохранения и других типов клеток с повреждениями ДНК в рассматриваемый период. Это могут быть, в частности, клетки, в которых произошла репарация ДР ДНК, в том числе, за время остановки клеточного цикла, но при этом появились нарушения в структуре ДНК в результате репарации ДР ДНК с ошибками, например, при использовании механизма негомлогичного соединения концов в местах ДР. Гибель клеток с такими повреждениями может происходить преимущественно в процессе митоза по механизму митотической катастрофы, что приведет к последующему снижению гибели клеток по механизму апоптоза. Возможная последовательность таких событий представлена на рис. 6.



Рис. 6. Механизмы развития гибели и появления клеток с радиационно-индуцированной генетической нестабильностью в зависимости от активности и качества репарации ДНК

Fig. 6. Mechanisms of death and appearance of cells with radiation-induced genetic instability, depending on the activity and quality of DNA repair

Заклучение

Показано, что при однократном общем пролонгированном облучении мышей быстрыми нейтронами при низкой мощности дозы (2,13 мГр/ч) в диапазоне малых и низких доз 10 – 500 мГр при анализе частоты ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга регистрируются цитогенетические повреждения, что свидетельствует о биологической опасности таких воздействий. В указанном диапазоне доз частота появления ПХЭ с МЯ не зависела от дозы облучения мышей, что, по-видимому, обусловлено облучением с очень низкой мощностью дозы излучения. При дозе 500 мГр частота ПХЭ с МЯ остается повышенной, по крайней мере, до 72 ч после воздействия включительно. Снижение количества пролиферирующих клеток и блок клеточного цикла в фазе G₂/M через 24 ч после воздействия, а также снижение клеточности костного мозга через 24–72 ч обнаружены после облучения мышей нейтронами в дозе 500 мГр, но при дозе 10 мГр снижение ядросодержащих клеток в костном мозге наблюдали только через 24 ч, а остальные отмеченные нарушения при этой дозе отсутствовали, несмотря на близкий уровень цитогенетических повреждений.

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

E.Yu. Moskaleva, A.N. Romantsova, Yu.P. Semochkina, A.V. Rodina, I.V. Cheshigin, A.S. Degtyarev, A.S. Zhirnik

National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

Contact person: Elizaveta Yurievna Moskaleva: moskalevaey@mail.ru; Moskaleva_EY@nrcki.ru

ABSTRACT

Purpose: To analyze the level of cytogenetic damage and the activity of bone marrow cells proliferation in C57BL/6 mice after prolonged fast neutrons low dose irradiation at 10–500 mGy.

Material and methods: Male C57BL/6 mice at the age of 7–8 and 16 weeks were used in the experiments. Irradiation was carried out on an OR-M installation in the field of fast neutrons and gamma quanta using five Pu(α,n)Be radionuclide sources with a high fast neutron yield at a dose rate of 2.13 mGy/h. The frequency of polychromatophilic (PCE) and normochromic (NCE) erythrocytes with micronuclei (MN) and the ratio of PCE and NCE were analyzed using light microscopy after cytochemical staining of the bone marrow cells of control and irradiated mice. The proliferation activity of bone marrow cells was determined by the number of Ki-67⁺-cells. The parameters of the cell cycle and the level of apoptosis were studied after DNA staining with DAPI using flow cytometry. Statistical processing of the results was carried out according to the Student's method using the computer program Origin.

Results: It was found that prolonged irradiation of mice with fast neutrons at a low dose rate (2.13 mGy/h) at doses from 10 to 500 mGy after 24 h led to statistically significant increase in the frequency of PCE with MN at all studied doses. No dose dependence of this parameter was observed in the studied range. The increase in the frequency of PCE with MN at a dose of 500 mGy was prolonged and persisted for at least 72 h. A significant increase in the frequency of NCE with MN 24 h after irradiation was found only at a dose of 500 mGy, which persisted up to 48 h. At this dose, there was also a decrease in the number of nucleated cells in the bone marrow 24 – 72 h after exposure, a decrease in the number of Ki-67⁺-cells 24 h after irradiation of mice, a block of the cell cycle in the G₂/M phase, and a decrease of cells in the G₀/G₁ phase, but after 48 h, there were no disturbances in the cell cycle.

Conclusion: It has been shown that after a single total prolonged irradiation of mice at low doses (10–500 mGy), when analyzing the frequency of PCE with MN, cytogenetic damage is recorded in the bone marrow, which indicates the genetic danger of exposure to even such low levels of fast neutron irradiation. A decrease in Ki67⁺ cells and cell cycle arrest at the G₂/M phase were found only after irradiation of mice at a dose of 500 mGy and only 24 h after exposure, while the number of nucleated cells in the bone marrow at this dose was reduced, at least to 72 h.

Key words: micronuclei, bone marrow, cell cycle, cell proliferation, Ki-67, fast neutrons, prolonged irradiation, low dose, mice

For citation: Moskaleva EYu, Romantsova AN, Semochkina YuP, Rodina AV, Cheshigin IV, Degtyarev AS, Zhirnik AS. 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. Medical Radiology and Radiation Safety. 2021;66(6):26–33.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-26-33

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 10.08.2021. **Принята к публикации:** 21.09.2021.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Financing. The study had no sponsorship.
Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 10.08.2021 **Accepted for publication:** 21.09.2021.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Goodhead D.T. Neutrons are Forever! Historical Perspectives. *Intern. J. Radiat. Biol.* 2019;95;7:1–80. doi:10.1080/09553002.2019.1569782.
2. Vorozhtsova S.V., Bulynina T.M., Ivanov A.A. Cytogenetic Effects in Mice Bone Marrow after Irradiation by Fast Neutrons. *Aerospace and Environmental Medicine.* 2016;50;1:55–60.
3. Kagawa N., Shimura M., Takai A., Endo S., Fujikawa K. Relative Biological Effectiveness of Fission Neutrons for Induction of Micronucleus Formation in Mouse Reticulocytes in Vivo. *Mutation Res.* 2004;55;6(1-2):93–99. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.001.
4. Nair S., Engelbrecht M., Miles X., Ndimba R., Fisher R., du Plessis P., et al. The Impact of Dose Rate on DNA Double-Strand Break Formation and Repair in Human Lymphocytes Exposed to Fast Neutron Irradiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20;21:5350. doi: 10.3390/ijms20215350.
5. Turner H.C., Shuryak I., Taveras M., Bertucci A., Perrier J.R., Chen C., et al. Effect of Dose Rate on Residual γ H2AX Levels and Frequency of Micronuclei in X-Irradiated Mouse Lymphocytes. *Radiat. Res.* 2015;183:315–324. doi: 10.1667/RR13860.1.
6. Ulyanenko S., Pustovalova M., Koryakin S., Beketov E., Lychagin A., Ulyanenko L., et al. Formation of γ H2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:2645. doi: 10.3390/ijms20112645.
7. Schmid W. The Micronucleus Test. *Mutation Res.* 1975;31;1:9–15. doi: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
8. Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Aptikaeva G.F., Akhmadieva A.Kh., Smirnova E.N., Romanchenko S.P., et al. Peculiarities of the Effect of Low-Dose-Rate Radiation Simulating High-Altitude Flight Conditions on Mice in Vivo. *Radiat. Environ. Biophys.* 2007;46:131–135. doi: 10.1007/s00411-007-0107-2.
9. Mozdarani H., Khoshbin-Khoshnazar A.R. In Vivo Protection by Cimetidine Against Fast Neutron-Induced Micronuclei in Mouse Bone Marrow Cells. *Cancer Lett.* 1998;124;1:65–71. doi: 10.1016/s0304-3835(97)00451-5.
10. Bashlykova L.A. Inheritance of Cytogenetic and Molecular-Cellular Effects in Cells of Animals Bone Marrow at Chronic Impact of Ionizing Radiation. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.* 2017;19;2(3):420–425. (In Russ.). [Башлыкаова Л.А. Наследование цитогенетических и молекулярно-клеточных эффектов в клетках костного мозга животных при хроническом воздействии ионизирующего излучения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т.19, № 2(3). С. 420–425].
11. A Review of Human Carcinogens. Part D: Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012;100D:231–239.
12. Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Aptikaeva G.F., Akhmadieva A.Kh., Klovov D.Yu., Smirnova H.N., Balakin V.E. Investigation of the Low-Dose γ -Irradiation Effect on the Spontaneous and High-Dose Radiation-Induced Level of Cytogenetic Damage in Mouse Bone Marrow Cells in Vivo. *Int. J. Low. Radiation.* 2006;2;1/2:1–12. doi: 10.1504/IJLR.2006.007890.
13. Bannister L.A., Mantha R.R., Devantier Y., Petoukhov E.S., Brideau C.L., Serran M.L., Klovov D.Y. Dose and Radioadaptive Response Analysis of Micronucleus Induction in Mouse Bone Marrow. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:1548. doi:10.3390/ijms17091548.
14. Lia W., Wang G., Cui J., Xue L., Cai L. Low-Dose Radiation (LDR) Induces Hematopoietic Hormesis: LDR-Induced Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells into Peripheral Blood Circulation. *Experim. Hematol.* 2004;32:1088–1096. doi: 10.1016/j.exphem.2004.07.015.