

Д.В. Фомина^{1,3}, А.В. Точиленко^{1,3}, Т.П. Калинин³, Р.М. Саримов⁴,
Е.О. Левинтас³, А.С. Кузьмина³, С.И. Шубина³, С.А. Абдуллаев^{1,2,3}

ОЦЕНКА «ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ» ПРИ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК, ОБЛУЧЕННОЙ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ИЛИ ОБРАБОТАННОЙ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА

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

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

³ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

⁴ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Контактное лицо: Серажутдин Абдуллаевич Абдуллаев, e-mail: saabdullaev@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Оценить возможность проявления «эффекта свидетеля» при введении необлученным мышам митохондриальной ДНК, облученной рентгеновским излучением или обработанной перекисью водорода.

Материал и методы: В работе использовались самцы мышей линии *Balb/c* 2-х месячного возраста. Митохондриальная ДНК (мтДНК) вводилась мышам внутривенно в физиологическом растворе (в количестве 20 мг/мышь) – интактная, облученная в дозе 5 Гр, а также обработанная перекисью водорода. МтДНК выделялась из митохондрий печени мышей. Для очистки полученной мтДНК от фрагментов ядерной ДНК (ядДНК) митохондрии обрабатывались нуклеазой. Животных умерщвляли через 1, 3, 7, 14, 21, 30 сут после инъекции мтДНК. Далее определялись следующие параметры: копийность мтДНК в клетках тканей, уровень экспрессии митохондриальных генов, уровень повреждения внутриклеточной мтДНК, относительное количество мутантных копий мтДНК, уровень микроядер в клетках. Для анализа этих параметров использовались головной мозг, сердце, печень, селезенка. Определение уровня микроядер проводили в клетках костного мозга.

Результаты: Показано, что введение мышам внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр и обработанной перекисью водорода, приводило к общему характеру изменений. С момента инъекции в тканях головного мозга и сердца происходило снижение количества копий мтДНК примерно в 2–3 раза. В клетках печени и селезенки количество копий мтДНК увеличивалось на протяжении 24 часов примерно в 3 раза, через 72 ч число копий мтДНК снижалось к контрольному уровню. В клетках головного мозга и сердца количество транскриптов гена *ATP6* увеличивалось вплоть до 72 ч с момента инъекции. Через 72 ч относительное количество транскриптов гена *ATP6* в тканях головного мозга и сердца превышало в 10 и 12 раз соответственно. Затем наблюдалось снижение этого параметра, причем через 14 сут с момента инъекции мтДНК, количество транскриптов гена *ATP6* все еще превышало контрольный уровень в 5 раз. Однако эти изменения нельзя было назвать достоверными из-за большого значения величины стандартного отклонения. В клетках печени и селезенки через 7 сут с момента проведения инъекции мтДНК количество транскриптов гена *ATP6* увеличивалось в 3 раза относительно контроля. Изменения параметров повреждения и образования мутаций мтДНК в этих тканях, а также образование микроядер в клетках костного мозга после инъекции мтДНК не отличались достоверно от контрольных значений.

Заключение: Таким образом, исходя из полученных результатов исследований, гипотеза о том, что митохондриальная внеклеточная ДНК может вызывать «эффект свидетеля» на уровне целого организма, не получила подтверждения.

Ключевые слова: мтДНК, эффект свидетеля, окислительный стресс, рентгеновское облучение

Для цитирования: Фомина Д.В., Точиленко А.В., Калинин Т.П., Саримов Р.М., Левинтас Е.О., Кузьмина А.С., Шубина С.И., Абдуллаев С.А. Оценка «эффекта свидетеля» при введении мышам митохондриальной ДНК, облученной рентгеновским излучением или обработанной перекисью водорода // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 5. С. 13–19. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-5-13-19

D.V. Fomina^{1,3}, A.V. Tochilenko^{1,3}, T.P. Kalinin³, R.M. Sarimov⁴,
E.O. Levintas³, A.S. Kuzmina³, S.I. Shubina³, S.A. Abdullaev^{1,2,3}

Evaluation of the «Bystander Effect» when Injecting Mice with X-Ray-Irradiated or Hydrogen Peroxide-Treated Mitochondrial DNA

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

³ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

⁴ A.M. Prokhorov General Physics Institute, Moscow, Russia

Contact person: S.A. Abdullaev, e-mail: saabdullaev@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: To assess the possibility of the “bystander effect” occurring when non-irradiated mice were injected with mitochondrial DNA irradiated with X-rays or treated with hydrogen peroxide.

Material and methods: Male *Balb/c* mice aged 2 months were used. Mitochondrial DNA (mtDNA) was injected intraperitoneally in saline (20 mg/mouse) – intact, irradiated at a dose of 5 Gy, and treated with hydrogen peroxide. mtDNA was isolated from mouse liver mitochondria. To purify the obtained mtDNA from nuclear DNA (nDNA) fragments, the mitochondria were treated with nuclease. Animals were sacrificed 1, 3, 7, 14, 21, and 30 days after mtDNA injection. The following parameters were then determined: mtDNA copy number in tissue cells, mitochondrial gene expression, intracellular mtDNA damage, the relative number of mutant mtDNA copies, and the level of micronuclei in cells. The brain, heart, liver, and spleen were used to analyze these parameters. Micronuclei levels were determined in bone marrow cells.

Results: Injecting mice with intact extracellular mitochondrial DNA irradiated at a dose of 5 Gy and treated with hydrogen peroxide resulted in a general pattern of changes. From the moment of injection, the mtDNA copy number in brain and heart tissues decreased by approximately 2–3 times. In liver and spleen cells, the mtDNA copy number increased approximately 3-fold over 24 hours, and after 72 hours, the mtDNA copy number decreased to control levels. In brain and heart cells, the amount of ATP6 gene transcripts increased for up to 72 hours after injection. After 72 hours, the relative amounts of ATP6 gene transcripts in brain and heart tissues exceeded the control level by 10 and 12 times, respectively. A decrease in this parameter was then observed, with ATP6 gene transcript levels still exceeding control levels by five times 14 days after mtDNA injection. However, these changes were not considered significant due to the large standard deviation. In liver and spleen cells, ATP6 gene transcript levels increased threefold relative to control levels seven days after mtDNA injection. Changes in parameters such as mtDNA damage and mutations in these tissues, as well as micronuclei formation in bone marrow cells after mtDNA injection, did not differ significantly from control values.

Conclusion: Thus, based on the obtained research results, the hypothesis that mitochondrial extracellular DNA can cause a “bystander effect” at the level of the whole organism has not been confirmed.

Keywords: *mtDNA, bystander effect, oxidative stress, X-ray exposure*

For citation: Fomina DV, Tochilenko AV, Kalinin TP, Sarimov RM, Levintas EO, Kuzmina AS, Shubina SI, Abdullaev SA. Evaluation of the «Bystander Effect» when Injecting Mice with X-Ray-Irradiated or Hydrogen Peroxide-Treated Mitochondrial DNA. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2026;71(5):13–19. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-5-13-19

Введение

Начало изучения «эффекта свидетеля» (ЭС) относится к периоду с 1950-х по 1960-е гг. В это время было впервые обнаружено, что плазма крови облученных организмов обладает способностью вызывать повреждения в необлученных клетках. Позднее было показано наличие такого эффекта у людей, переживших ядерную бомбардировку в Хиросиме [1], пациентах после радиотерапии [2, 3], ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС [4], и детей, пострадавших при этой аварии [5, 6]. Причем следует заметить, что все эти события были показаны *in vivo*. Что же касается радиационного воздействия на культуры клеток *in vitro* пучками ионизирующих частиц, то впервые такие эксперименты были выполнены гораздо позже, в 1992 г. [7]. Практически с самого начала изучения ЭС ведутся поиски агента (или агентов), его вызывающего. Считается, что передача сигнала от поврежденных клеток к нормальным ведется двумя путями: через щелевые контакты (gap junction) близкорасположенных клеток, а также путем высвобождения в окружающую среду растворимых факторов, которые связываются с рецепторами на других клетках и вызывают в них ответ. В роли этих факторов исследователи рассматривают различные гормоны, белковые молекулы, низкомолекулярные соединения, такие как NO, активные формы кислорода, свободные радикалы, цитокины [8]. К настоящему времени можно точно утверждать, что ни один из рассматриваемых факторов не может на 100% осуществлять передачу сигнала другим клеткам, и, скорее всего, при облучении проявляется их сочетанное действие [9].

В дополнение к вышеуказанным факторам, в качестве одного из возможных агентов, вызывающих ЭС, рассматривается ДНК. Действительно, фрагменты ДНК из погибших клеток могут выходить в окружающую их среду, а при попадании в кровяное русло могут разноситься по всему организму, вызывая ответ на повреждение за пределами ткани, получившей непосредственное воздействие повреждающего фактора. Например, в работе И.Н. Васильевой [10] показано, что концентрация низкомолекулярных фрагментов ДНК в плазме крови крыс находится в прямой зависимости от дозы облучения в очень широком диапазоне доз (от 8 до 100 Гр). Известно, что при гибели клеток, получивших воздействие

ионизирующей радиации, ДНК в них получает окислительные повреждения, одно- и двунитевые разрывы, модификацию сахарных остатков, депуринизацию и деаминизацию оснований [11]. Такие поврежденные молекулы ДНК могут являться сигнальными факторами окислительного стресса. В частности, в работе [12] показано, что *in vitro* добавление к интактным клеткам эндотелия внеклеточных фрагментов ДНК, вышедших из облученных в дозе 10 сГр клеток, приводит к увеличению уровня одно- и двунитевых разрывов ДНК, полимеризации актина, изменению формы ядра в необлученных клетках. Авторы статьи предполагают, что передача ответа в необлученных клетках происходит через активацию TLR9 рецептора. Этот рецептор сравнительно мало изучен, предполагается, что он распознает CpG островки, которых в ДНК млекопитающих сравнительно мало по сравнению с ДНК бактерий и вирусов, и, таким образом, отвечает за функционирование врожденного иммунитета к бактериальным и вирусным инфекциям [13]. Однако в научной литературе сравнительно мало рассматривается мтДНК как возможный агент передачи ЭС в организме при облучении. А ведь известно, что мтДНК, в силу своего бактериального происхождения отличается от ДНК, находящейся в ядре. В частности, мтДНК несет повышенное количество островков CpG, которые сравнительно слабо метилированы по сравнению с яДНК. Кроме того, сами митохондрии имеют в составе своих белков формилметионин, что делает их очень похожими в этом отношении на бактерии [14]. Недавними исследованиями показано, что митохондрии, выходящие из механически разрушенных клеток при травмах, вызывают в организме воспалительный процесс, схожий с тем, что протекает при бактериальной инфекции [15, 16].

Предыдущие наши исследования показали, что в клетках органов мышей, не подвергавшихся непосредственному воздействию рентгеновского излучения, наблюдаются значительные изменения копийности как самой мтДНК, так и относительного числа транскриптов ее гена *ATP6*. Эти изменения сохраняются на протяжении значительного срока после облучения, вплоть до трех недель, что позволяет предполагать, что наблюдаемые изменения возможно обусловлены возникновением ЭС после локального облучения головного мозга рентгеновским излучением [17].

В настоящей работе мы пытались проверить гипотезу о том, что мтДНК, сама по себе, как молекула, имеющая бактериальное происхождение, в случае появления ее в свободном виде вне клеток, может вызывать в организме воспалительный процесс. В связи с этим оценивались следующие параметры: копияность мтДНК в клетках тканей, уровень экспрессии митохондриальных генов, уровень повреждения внутриклеточной мтДНК, относительное количество мутантных копий мтДНК, уровень микроядер в клетках. Для анализа этих параметров использовались головной мозг, сердце, печень, селезенка. Определение уровня микроядер проводили в клетках костного мозга.

Материал и методы

В исследовании использовались лабораторные мыши линии *BALB/c* из питомника Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директивой 2010/63/EU. В ходе эксперимента животные находились в стандартных условиях вивария ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Аклиматизация животных проходила в течение 1 недели до начала экспериментов. Мышей кормили стандартным гранулированным кормом для лабораторных животных (ООО «Мест», Москва) – мышей *ad libitum*, со свободным доступом к чистой питьевой воде. Они были размещены по пять особей в клетках при стандартном 12-часовом цикле свет/темнота при температуре 22 ± 2 °C и при влажности 45 ± 5 %.

Митохондриальную ДНК вводили (в количестве 20 мкг/мышь) необлученным мышам внутрибрюшинно в физиологическом растворе в интактной форме, облученной рентгеновским излучением или обработанной перекисью водорода. Облучение мтДНК *in vitro* проводили в дозе 5 Гр в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна на рентгеновской биологической установке РУСТ-М1 при напряжении 200 кВ, токе на трубке 2,5 мА, фильтре алюминевом 1,5 мм. Мощность дозы рентгеновского облучения – 1 Гр/мин. Забой животных проводился с помощью цервикальной дислокации через 1, 3, 7, 14, 21, 30 сут после инъекции мтДНК.

После извлечения из животных ткани гомогенизировались на льду, после чего масса гомогената разделялась на две части для выделения ДНК и РНК соответственно. Выделение ДНК проводилось с помощью реагента “ДНК-Экстрен-2” (ЗАО «Синтол», Россия). РНК из гомогената тканей выделялась с использованием реагента “РНК-Экстрен” (ЗАО «Синтол», Россия). Оценку концентрации ДНК и РНК в образцах проводили на флуориметре Qubit (Invitrogen, США).

Оценка числа копий мтДНК и экспрессии митохондриального гена *ATP6* проводилась методом ПЦР в реальном времени, с использованием специфических праймеров на приборе на приборе ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия) с использованием набора “2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя Sybr Green I” (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Анализ кривых плавления был выполнен для всех генов, а специфичность и целостность продуктов ПЦР были подтверждены присутствием одного пика. Для анализа использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$. ПЦР-тесты проводили трехкратно для каждого образца. Результаты рассчитывались относительно яДНК, с использованием в качестве внутреннего контроля однокопийного ядерного гена *GAPDH*. Количество не-

облученных мышей было принято за 100%. Циклы ПЦР были следующими: 5 мин при 95°C с последующими 40 циклами (95°C в течение 30 с, отжиг и удлинение при 60°C в течение 1 мин).

Анализ уровня повреждений мтДНК был проведен с использованием метода количественной ПЦР на протяженных фрагментах (ПЦР-ПФ) с учетом нашего предыдущего опыта [18, 19]. Для амплификации протяженных ампликонов использовали (2U/мкл) KAPA Long Range Hot Start Kit (KAPA Biosystems, США). Для амплификации длинного фрагмента мтДНК (10.9 т.п.о.) использовали следующие праймеры: forward 5'-GCC AGC CTG ACC CAT AGC CAT AAT AT-3'; reverse 5'-GAG AGA TTT TAT GGG TGT AAT GCG G-3'. Программа включала начальную денатурацию при 94°C в течение 5 мин и 18 циклов при 94°C в течение 30 сек и 68°C в течение 12,5 мин с конечной элонгацией при 72°C в течение 10 мин. Предварительные анализы были выполнены, чтобы гарантировать линейность амплификации ПЦР в отношении количества циклов и концентрации ДНК. Поскольку амплификация небольшой области была бы относительно независимой от повреждения ДНК (низкая вероятность), небольшие фрагменты мтДНК также были амплифицированы для нормализации данных, полученных с большими фрагментами. Для амплификации коротких фрагментов мтДНК (117 п.о.) использовали следующие праймеры: forward 5'-CCC AGC TAC TAC CAT CAT TCA AGT-3'; reverse 5'-GAT GGT TTG GGA GAT TGG TTG ATG T-3'. ПЦР-анализы проводили трехкратно для каждого образца ДНК. Все амплифицированные продукты были разделены и визуализированы с использованием электрофореза в агарозном геле и количественно определены с помощью системы Image Quant (Molecular Dynamics, США).

Для определения количества мутантных копий мтДНК, использовали набор Surveyor Mutation Detection Kit (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA), как описано [20]. Для оценки мутаций в мтДНК, амплифицировали фрагмент, включающий ген *D-loop 1* (1092 п.н.). Праймеры для ПЦР, использованные в этих анализах, приведены в табл. 1. ПЦР проводилась на программируемом амплификаторе Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала: 75 mM Трис-HCl, pH 8,8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 mM $MgCl_2$, 200 мкМ каждого dNTP, 250 нМ каждого праймера, 0,01% твин-20. В реакционную смесь вводили 1 нг ДНК и 1 суммарную единицу смеси Taq-и Pfu-полимераз (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), которую вносили методом “горячего старта” после первичной денатурации ДНК-матриц при 94°C в течение 4 мин. ПЦР проводили в режиме 40 циклов: денатурация 30 сек при 94°C, отжиг 30 сек при

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе Primers used in the work

Локус	Праймеры, зонды	5'→3' последовательность	Размер, п.о.
мтДНК	for rev	GCCAGCCTGACCCATAGCCATAATAT GAGAGATTTTATGGGTGTAATGCGG	10.9 kb
мтДНК	for rev	CCCAGCTACTACCATCATTTCAAGT GATGGTTTGGGAGATTGGTTGATGT	117
<i>ATP6</i>	for rev	CCATAAATCTAAGTATAGCCATTCAC AGCTTTTAGTTTGTGTCGGAAG	75
<i>GAPDH</i>	for rev	GTGAGGGAGATGCTCAGTGT CTGGCATTGCTCTCAATGAC	214
<i>D-loop 1</i>	for rev	TAAACATTACTCTGGTCTTGTAACCC ATTAATAAGGCCAGGACCAACCT	1092

62°C и элонгация 1 мин при 72°C, после которых завершающая инкубация 4 мин при 72°C. После завершения реакции все продукты ПЦР образцов ДНК были доведены до одинаковой концентрации путем добавления ТЕ буфера. Для получения гетеродуплексов смешивали равные объемы (по 7 мкл) ПЦР-ампликонов мтДНК исследуемых тканей облученных и контрольных мышей. Смеси нагревали при 95°C в течение 10 мин и медленно охлаждали до 40°C в течение 70 мин при скорости снижения температуры 0,3°C/мин. Затем образцы выдерживали 45 минут при комнатной температуре. К смеси гетеродуплексов добавляли 1/10 объема 0,15 М раствора $MgCl_2$, 1 мкл Surveyor Enhancer S и 1 мкл Surveyor Nuclease S. Смесь инкубировали при 42°C в течение 60 мин. Затем реакцию останавливали добавлением 1/10 объема Stop-раствора в соответствии с протоколом производителя (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). Продукты расщепления эндонуклеазой анализировали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. ПЦР-тестирование гетеродуплексов проводили трехкратно для каждого образца ДНК. Интенсивность флуоресценции полос ДНК в гелях регистрировали с помощью AlphaImager Mini System (Alpha Innotech, Foster City, USA). Отношение флуоресценции продуктов расщепления к общей интенсивности флуоресценции полос ДНК в геле (% ДНК, расщепленной Surveyor Nuclease) рассчитывали с использованием пакета программ ImageJ (Wayne Rasband, Bethesda, USA).

Цитогенетический анализ по определению уровня образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга мышей проводили как описано в работе [21]. В качестве контроля использовали intactных мышей. Красный костный мозг бедренной кости вымывали с помощью фетальной сыворотки теленка. Суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли и клетки повторно ресуспендировали в оставшейся сыворотке. Далее изготавливали мазки по стандартной методике, затем фиксировали их метанолом и проводили окрашивание по Романовскому–Гимзе. Для каждой мыши были подготовлены по четыре слайда, в общей сложности были подсчитаны около 2000 ПХЭ. Подсчет ПХЭ с МЯ на слайдах осуществляли с помощью светового микроскопа с использованием иммерсионного масла с объективом при увеличении $\times 1000$.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$). Значение $p < 0,05$ (*) считалось статистически значимым.

Результаты

На рис. 1 представлены данные анализов изменения относительного числа копий мтДНК в тканях мышей после внутрибрюшинного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в intactной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. Как показывают результаты данных анализов, введение мышам внеклеточной митохондриальной ДНК в intactной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанную перекисью водорода, приводило к общему характеру изменений. Из рис. 1а–б видно, что через 1 сут с момента инъекции в тканях головного мозга и сердца происходило резкое снижение количества копий мтДНК примерно

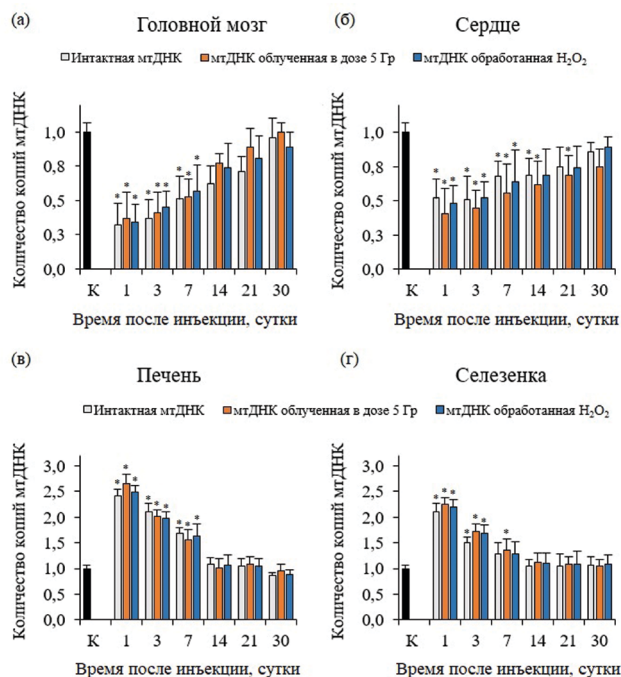


Рис. 1. Изменение относительного числа копий мтДНК в тканях мышей после внутрибрюшинного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в intactной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. (а) – головной мозг, (б) – сердце, (в) – печень, (г) – селезенка. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$). $p < 0,05$ (*) считалось статистически значимым

Fig. 1. Changes in the relative number of mtDNA copies in mouse tissues after intraperitoneal administration of cell-free intact mitochondrial DNA irradiated at a dose of 5 Gy or treated with hydrogen peroxide. (a) Brain, (b) Heart, (c) Liver, (d) Spleen. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). $p < 0.05$ (*) was considered statistically significant

в 2–3 раза. В последующие же сроки наблюдения регистрировалось восстановление количества копий мтДНК как в ткани головного мозга, так и в ткани сердца. Причем в ткани головного мозга восстановление количества копий мтДНК происходило более выражено. Результаты анализов показали также, что в клетках печени и селезенки количество копий мтДНК увеличивалось на протяжении 24 ч примерно в 3 раза, однако через 72 ч число копий мтДНК снижалось к контрольному уровню (рис. 1в–г). Как известно, количество копий мтДНК часто возрастает при воспалении, так как поврежденные митохондрии выделяют мтДНК в цитоплазму и кровотоки, где она действует как молекулярный сигнал повреждения, активируя иммунный ответ (DAMPs), что приводит к усилению воспаления. Увеличение копий мтДНК наблюдается при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, включая системную склеродермию и инфаркт миокарда.

На рис. 2 представлены данные анализа изменения экспрессии гена *ATP6* мтДНК в тканях мышей после внутрибрюшинного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в intactной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. Результаты этих анализов показывают, что в клетках головного мозга и сердца количество транскриптов гена *ATP6* увеличивалось вплоть до 72 ч с момента инъекции. Через 72 ч, относительное количество транскриптов гена *ATP6* в тканях головного мозга и сердца превышало в 10 и 12 раз соответственно. Затем наблюдалось снижение этого параметра, причем через 14 сут с момента инъекции мтДНК, количество транскриптов гена *ATP6* все еще превышало контрольный уровень в 5 раз (рис. 2а–б). В

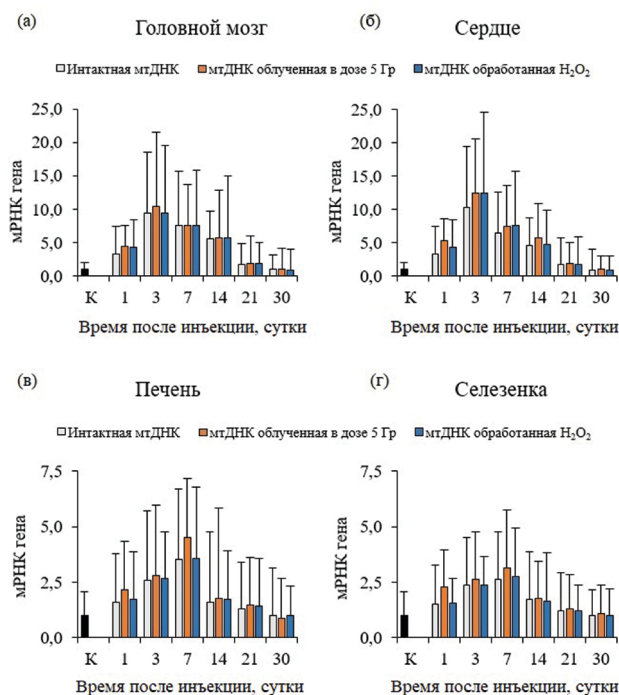


Рис. 2. Изменение экспрессии гена *ATP6* мтДНК в тканях мышей после внутривенного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. (а) – головной мозг, (б) – сердце, (в) – печень, (г) – селезенка. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$)

Fig. 2. Changes in mtDNA *ATP6* gene expression in mouse tissues after intraperitoneal administration of cell-free intact mitochondrial DNA irradiated at a dose of 5 Gy or treated with hydrogen peroxide. (a) Brain, (b) Heart, (v) Liver, (r) Spleen. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$)

клетках печени и селезенки через 7 сут с момента проведения инъекции мтДНК количество транскриптов гена *ATP6* увеличилось в 3 раза относительно контроля. Однако эти изменения нельзя было назвать достоверными из-за большого значения величины стандартного отклонения.

На рис. 3 представлены анализы уровня повреждений мтДНК методом ПЦР на протяженных фрагментах в тканях мышей после внутривенного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. Как показывают результаты данных анализов, введение мышам внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр, а также обработанной перекисью водорода, не приводило к образованию повреждений мтДНК во всех исследуемых тканях.

На рис. 4 представлены результаты оценки количества мутантных копий мтДНК в тканях мышей после внутривенного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. Данные анализы показали, что введение мышам внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр, а также обработанной перекисью водорода, как и в случае определения уровня повреждений мтДНК, не приводило к статистически достоверному повышению количества мутантных копий мтДНК во всех исследуемых тканях. Наблюдаемые изменения незначительны и не отличаются достоверно друг от друга из-за большого значения величины стандартного отклонения (SD).

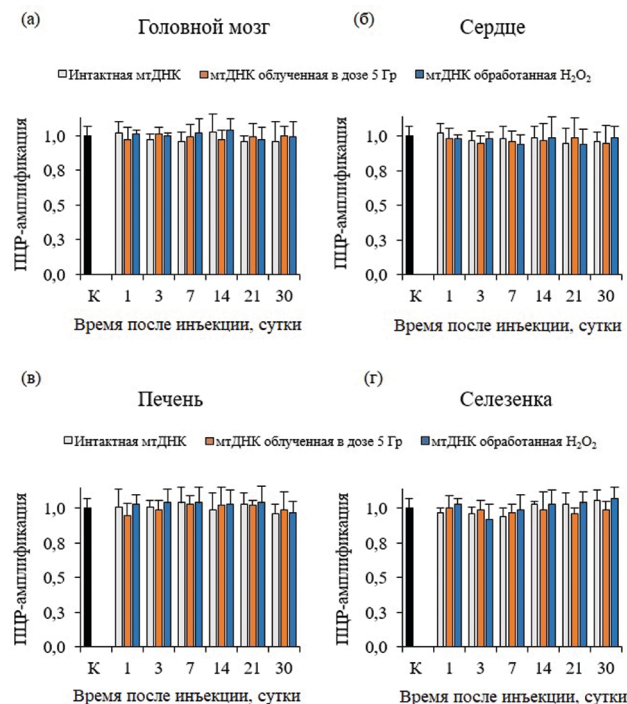


Рис. 3. Анализ уровня повреждений мтДНК в тканях мышей после внутривенного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. (а) – головной мозг, (б) – сердце, (в) – печень, (г) – селезенка. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$)

Fig. 3. Analysis of the level of mtDNA damage in mouse tissues after intraperitoneal administration of cell-free intact mitochondrial DNA in its intact form, irradiated at a dose of 5 Gy or treated with hydrogen peroxide. (a) – brain, (b) – heart, (v) – liver, (r) – spleen. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$)

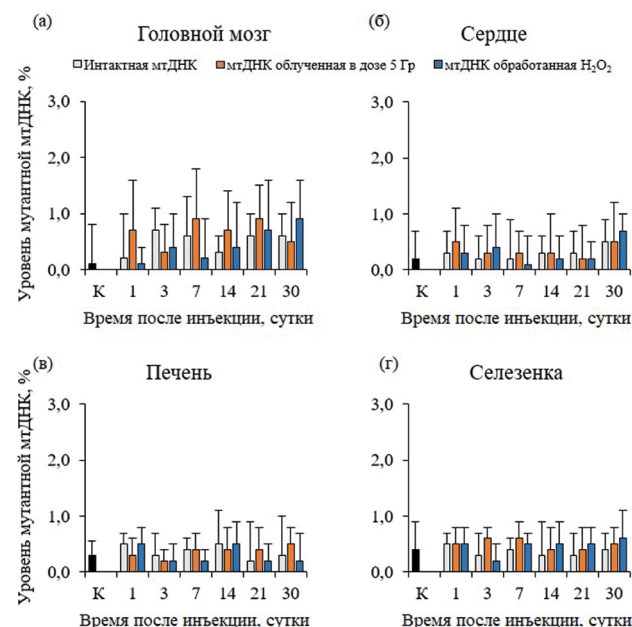


Рис. 4. Оценка количества мутантных копий мтДНК в тканях мышей после внутривенного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. (а) – головной мозг, (б) – сердце, (в) – печень, (г) – селезенка. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$)

Fig. 4. Evaluation of the number of mutant mtDNA copies in mouse tissues after intraperitoneal administration of cell-free intact mitochondrial DNA in its intact form, irradiated at a dose of 5 Gy or treated with hydrogen peroxide. (a) – brain, (b) – heart, (v) – liver, (r) – spleen. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$)

Аналогичные результаты были получены при анализе уровня микроядер в клетках костного мозга после инъекции мтДНК (рис. 5). Из данного рисунка видно, что введение мышам внеклеточной митохондриальной ДНК не приводило к статистически достоверным изменениям уровня микроядер в клетках костного мозга.

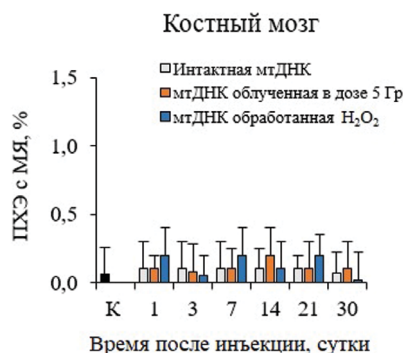


Рис. 5. Анализ микроядер (МЯ) в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) в клетках костного мозга мышей после внутрибрюшинного введения внеклеточной митохондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода. Данные представлены в виде средней величины $\pm$ SD ($n = 8$)
Fig. 5. Analysis of micronuclei (MN) in polychromatophilic erythrocytes (PCE) in mouse bone marrow cells after intraperitoneal administration of intact extracellular mitochondrial DNA irradiated at a dose of 5 Gy or treated with hydrogen peroxide. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$)

Заключение

Исследования, посвященные изучению механизмов передачи клеткам-свидетелям информации о

повреждающем воздействии, активно продолжают-ся, однако природа всех факторов сигнального пути остается не до конца известна. Основное внимание исследователей было сосредоточено на факторах белковой природы, прежде всего, на различных цитоки-нах [22–24]. Предполагалось также участие в пере-даче сигналов ЭС активных форм кислорода и азота [25–28]. В 2007 г. сотрудниками лаборатории молеку-лярной биологии МГНЦ РАМН было впервые выска-зано предположение о возможной роли внеклеточной ДНК в реализации ЭС [29, 30].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в клетках органов мышей, не подвергавшихся непосредственному воздействию рентгеновского излу-чения, наблюдаются значительные изменения копий-ности как самой мтДНК, так и относительное число транскриптов ее гена – *ATP6* [17]. Эти изменения со-храняются на протяжении значительного срока после облучения, вплоть до трех недель, что позволило нам предположить, что наблюдаемые изменения обуслов-лены возникновением ЭС, возникшего после локаль-ного облучения головного мозга. Однако резюмируя данные, полученные в настоящей работе, можно ут-верждать, что введение мышам внеклеточной мито-хондриальной ДНК в интактной форме, облученной в дозе 5 Гр или обработанной перекисью водорода, не приводило к статистически достоверным изменениям в тканях.

Таким образом, исходя из полученных результатов исследований, гипотеза о том митохондриальная вне-клеточная ДНК может вызывать ЭС на уровне целого организма, не получила подтверждения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Pant G.S., Kamada N. Chromosome Aberrations in Normal Leukocytes Induced by the Plasma of Exposed Individuals. *J Med Sci.* 1977;26;2-3:149-154.
- Hollowell J.G., Littlefield L.G. Chromosome Damage Induced by Plasma of X-Rayed Patients: an Indirect Effect of X-Ray. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1968;129;1:240-244. Doi: 10.3181/00379727-129-33295.
- Littlefield L.G., Hollowell Jr J.G., Pool Jr W.H. Chromosomal Aberrations Induced by Plasma from Irradiated Patients: an Indirect Effect of X Radiation. Further Observations and Studies of a Control Population. *Radiology.* 1969;93;4:879-886. Doi: 10.1148/93.4.879.
- Marozik P., Mothersill C., Seymour C.B., Mosse I., Melnov S. Bystander Effects Induced by Serum from Survivors of the Chernobyl Accident. *Exp Hematol.* 2007;35;4:1:55-63. Doi: 10.1016/j.exphem.2007.01.029.
- Emerit I., Quastel M., Goldsmith J., Merkin L., Levy A., Cernjanski L., et al. Clastogenic Factors in the Plasma of Children Exposed at Chernobyl. *Mutat Res.* 1997;373;1:47-54. Doi: 10.1016/S0027-5107(96)00187-X.
- Gemignani F., Ballardin M., Maggiani F., Rossi A.M., Antonelli A., Barale R. Chromosome Aberrations in Lymphocytes and Clastogenic Factors in Plasma Detected in Belarus Children 10 Years after Chernobyl Accident. *Mutat Res.* 1999;446;2:245-253. Doi: 10.1016/S1383-5718(99)00194-1.
- Nagasawa H., Little J.B. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of Alpha-Particles. *Cancer Res.* 1992;52;22:6394-6.
- Ghosh G. Radiation-Induced Bystander Effect and Its Possible Countermeasures. *J Cell Signal.* 2023;4;1:13-20. Doi: 10.33696/Signaling.4.086.
- Gilbert A., Payet V., Bernay B., Chartier-Garcia E., Testard I., Candéas S.M., Chevalier F. Label-Free Direct Mass Spec-trometry Analysis of the Bystander Effects Induced in Chon-drocytes by Chondrosarcoma Cells Irradiated with X-rays and Carbon Ions. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2022;27;9:277. Doi: 10.31083/j.fbl2709277.
- Vasilyeva I.N. Low-Molecular-Weight DNA in Blood Plasma as an Index of the Influence of Ionizing Radiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:221-8. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03889.x.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. *FASEB J.* 2003;17;10:1195-1214. Doi: 10.1096/fj.02-0752rev.
- Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Smirnova T.D., Malinovskaya E.M., Efremova L.V., Veiko N.N. An Extracellular DNA Mediated Bystander Effect Produced from Low Dose Irradiated Endothelial Cells. *Mutat Res.* 2011;712;1-2:1-10. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.002.
- Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-Like Receptors: Their Roles in Bacterial Recognition and Respiratory Infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6;4:479-495. Doi: 10.1586/14787210.6.4.479.
- Taanman J.W. The Mitochondrial Genome: Structure, Tran-scription, Translation and Replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410;2:103-123. Doi: 10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- Zhang Q., Raoof M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., et al. Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury. *Nature.* 2010;464;7285:104-107. Doi: 10.1038/nature08780.
- Liu Q., Wu J., Zhang X., Li X., Wu X., Zhao Y., Ren J. Circulating Mitochondrial DNA-Triggered Autophagy Dysfunction via STING Underlies Sepsis-Related Acute Lung Injury. *Cell Death Dis.* 2021;12;7:673. Doi: 10.1038/s41419-021-03961-9.
- Абдуллаев С.А., Фомина Д.В., Менухов В.О., Душенко М.В., Точилко А.В., Калинин Т.П., Евдокимовский Э.В. Изме-нение копийности и экспрессии генов мтДНК в различных тканях мышей при локальном облучении головного мозга // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т.70. №2. С. 16-22 [Abdullayev S.A., Fomina D.V., Me-

- nukhov V.O., Dushenko M.V., Tochilenko A.V., Kalinin T.P., Yevdokimovskiy E.V. Changes in the Copy Number and Gene Expression of mtDNA in Various Tissues of Mice Exposed to Local Brain Irradiation. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost'* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70;2:16–22 (In Russ.]. Doi: 10.33266/1024-6177-2025-70-2-16-2218.
18. Abdullaev S., Gubina N., Bulanov T., Gaziev A. Assessment of Nuclear and Mitochondrial DNA, Expression of Mitochondria-Related Genes in Different Brain Regions in Rats after Whole-Body X-Ray Irradiation. *Int J Mol Sci.* 2020;21;4:1196. Doi: 10.3390/ijms21041196.
 19. Abdullaev S.A., Glukhov S.I., Gaziev A.I. Radioprotective and Radiomitigative Effects of Melatonin in Tissues with Different Proliferative Activity. *Antioxidants.* 2021;10:1885. Doi: 10.3390/antiox10121885.
 20. Abdullaev S., Bulanov T., Timoshenko G., Gaziev A.I. Increase of mtDNA Number and its Mutant Copies in Rat Brain after Exposure to 150 MeV Protons. *Mol. Biol. Reports.* 2020;47:4815-4820. Doi: 10.1007/s11033-020-05491-7.
 21. Abdullaev S., Minkabirova G., Karmanova E., Bruskov V., Gaziev A. Metformin Prolongs Survival Rate in Mice and Causes Increased Urinary Excretion of Cell-Free DNA in X-Irradiated Rats. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2018;831:13-18. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.006.
 22. Mothersill C., Seymour C. Radiation-Induced Bystander Effects: Past History and Future Directions. *Radiat Res.* 2001;155;6:759-67. Doi: 10.1667/0033-7587(2001)155[0759:ribeph]2.0.co;2.
 23. Nikjoo H., Khvostunov I.K. Biophysical Model of the Radiation-Induced Bystander Effect. *Int J Radiat Biol.* 2003;79;1:43-52.
 24. Nikjoo H., Khvostunov I.K. A Theoretical Approach to the Role and Critical Issues Associated with Bystander Effect in Risk Estimation. *Hum Exp Toxicol.* 2004;23(2):81=6. Doi: 10.1191/0960327104ht422oa.
 25. Azzam E.I., De Toledo S.M., Spitz D.R., Little J.B. Oxidative Metabolism Modulates Signal Transduction and Micro-nucleus Formation in Bystander Cells from Alpha-Particle-Irradiated Normal Human Fibroblast Cultures. *Cancer Res.* 2002;62;19:5436-42.
 26. Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A., Kobayashi Y., Ohnishi T. Vanguard of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses. *J Radiat Res.* 2007;48;2:97-106. Doi: 10.1269/jrr.06090.
 27. Matsumoto H., Tomita M., Otsuka K., Hatashita M., Hamada N. Nitric Oxide is a Key Molecule Serving as a Bridge between Radiation-Induced Bystander and Adaptive Responses. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4;2:126-34. Doi: 10.2174/1874467211104020126.
 28. Morgan W.F. Communicating Non-Targeted Effects of Ionizing Radiation to Achieve Adaptive Homeostasis in Tissues. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4;2:135-40.
 29. Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Ершова Е.С., Еголина Н.А., Вейко Н.Н. Фрагменты внеклеточной ДНК из среды культивирования лимфоцитов человека, облученных в малых дозах, запускают развитие окислительного стресса и адаптивного ответа в необлученных лимфоцитах-свидетелях // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т.48. №5. С. 553-564 [Yermakov A.V., Kon'kova M.S., Kostyuk S.V., Yershova Ye.S., Yegolina N.A., Veyko N.N. Fragments of Extracellular DNA from the Culture Medium of Human Lymphocytes Irradiated in Low Doses Trigger the Development of Oxidative Stress and an Adaptive Response in Non-Irradiated Bystander Lymphocytes. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2008;48;5:553-64 (In Russ.)].
 30. Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Alekseeva A.Y., Smirnova T.D., Glebova K.V., Efremova L.V., Baranova A., Veiko N.N. Role of Extracellular DNA Oxidative Modification in Radiation Induced Bystander Effects in Human Endothelialocytes. *Mutat Res.* 2012;729;1-2:52-60. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.09.005.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00446).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.04.2026. Принята к публикации: 25.05.2026.

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

Financing. This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-24-00446).

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

Article received: 20.04.2026. Accepted for publication: 25.05.2026.