

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 575.224.23:591.111.1:599.824:621.3.038.628:539.1.047

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ
ОБЕЗЬЯН *Macaca mulatta* В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ
УСКОРЕННЫМИ ИОНАМИ КРИПТОНА**

© 2024 г. И. В. Кошлань^{1,2*}, Н. А. Кошлань¹, М. Д. Исакова¹,
Ю. В. Мельникова¹, А. Г. Беляева³, А. А. Перевезенцев³, А. С. Штемберг³,
И. Н. Клоц⁴, Т. Е. Гвоздик⁴, А. Н. Бугай^{1,3}

¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

²Государственный университет “Дубна”, Дубна, Россия

³Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических
проблем РАН, Москва, Россия

⁴Институт медицинской приматологии “НИЦ “Курчатовский институт”, Сочи, Россия

*E-mail: koshlan@jinr.ru

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Проведено исследование цитогенетических нарушений, возникающих в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta*, после локального воздействия ускоренных ионов криптона ⁷⁸Kr в дозе 3 Гр на область гиппокампа животных. В ходе анализа в контрольной группе обезьян выявлен низкий уровень хромосомных аберраций. Количество клеток с хромосомными нарушениями не превышало 1.67 %. Основную долю составляли аберрации хроматидного типа. Проведенный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся воздействию ускоренных ионов криптона, выявил максимальный уровень хромосомных нарушений через сутки после облучения, который превышал контрольный в 2.7 раза. К 96-м суткам количество аберраций снизилось в 1.7 раза, что по-прежнему превышало контрольный уровень. К 460-м суткам у некоторых животных зафиксировано незначительное повышение количества аберраций по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В отдаленные сроки у ряда облученных животных наблюдали отклонения от стандартного поведения обезьян. Сопоставлены данные хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян и человека после облучения *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ. Актуальность данной работы обусловлена подготовкой к осуществлению межпланетных пилотируемых космических экспедиций.

Ключевые слова: обезьяны, *Macaca mulatta*, ускоренные ионы, лимфоциты, дицентрики, биологическая дозиметрия, космическая радиобиология

DOI: 10.31857/S0869803124020042, **EDN:** NBLJME

На современном этапе развития космической радиобиологии перед исследователями стоят задачи определения критических параметров, ограничивающих работу космических экипажей за пределами магнитосферы Земли. Появились литературные данные, указывающие на уязвимость центральной нервной системы к воздействию космической радиации и возможному нарушению когнитивных функций у животных [1–2]. В ходе выполнения межпланетных экспедиций возрастает риск облучения экипажа ускоренными тяжелыми заряженными частицами (ТЗЧ) высоких энергий. Вероятность радиационного поражения в этих условиях рассматривается как результат действия ТЗЧ на критические структуры центральной нервной системы, что, в свою очередь, может вызвать изме-

нения высших интегративных функций мозга и привести к нарушениям операторской деятельности экипажей. Это обусловило формирование новой концепции радиационного риска для пилотируемых полетов в дальнем космосе [3].

Спектр галактических космических лучей (ГКЛ) состоит из высокоэнергетических протонов и ТЗЧ с энергиями вплоть до сверхвысокого порядка 10²⁰ МэВ. Именно ускоренные ионы обладают высокой биологической эффективностью и, несмотря на низкие флюенсы, вносят определяющий вклад в радиационный риск для космонавтов. Защититься от таких высокоэнергетических излучений в условиях космического корабля чрезвычайно сложно. Воздействие этих излучений в наземных условиях возможно смоделировать, исполь-

зуя излучение ускорителей, генерирующих заряженные частицы с энергиями, соответствующими ГКЛ. В связи с планами по подготовке к полетам на Марс и изучением воздействия космической радиации, представляющей собой потенциальную угрозу для здоровья космонавтов, увеличилось число проводимых экспериментов на приматах. Только в США количество проведенных в 2016 г. экспериментов на нечеловекообразных обезьянах выросло на 15 % [4]. В ходе текущего исследования проведен эксперимент по локальному облучению ускоренными ионами криптона головы обезьян *Macaca mulatta* и, соответственно, головного мозга, обеспечивающего и определяющего состояние когнитивных функций приматов. Определенный интерес в данном исследовании представляет анализ хромосомных aberrаций, который является характерным и стабильным показателем воздействия радиации на клетки млекопитающих и может служить ретроспективным маркером в отдаленные сроки после облучения.

Работа выполнена в коллаборации с коллегами из Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт” и Института медико-биологических проблем РАН в рамках изучения поведенческих реакций и когнитивных функций у обезьян *Macaca mulatta* в условиях радиационного воздействия в соответствии с Программой подготовки межпланетных пилотируемых полетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 12 обезьянах-самцах вида *Macaca mulatta* в возрасте до 3 лет и средним весом 3 кг на момент облучения.

На первом этапе эксперимента животные были разделены на две группы. Группа из 12 обезьян являлась обобщенным контролем, часть из которых (пять особей) в последующем были облучены и составили вторую группу. В экспериментальной группе одна обезьяна (№ 383, ИМБП, Москва) за 3 мес. до облучения головы ионами $^{78}\text{Kг}$ находилась на протяжении 7 сут в условиях антиортостатической гипокинезии. Четыре обезьяны экспериментальной группы из питомника Института медицинской приматологии (г. Адлер) перед облучением головы животными ионами $^{78}\text{Kг}$ перенесли транспортировку самолетом Адлер–Москва.

Контрольную группу приматов разбили на несколько подгрупп, поскольку животные находились в разных городах (питомник в Адлере, виварий в Москве). Первую подгруппу (контроль со стрессом) составили четыре обезьяны, которые

перенесли транспортировку самолетом Адлер–Москва, и перед облучением у них был произведен забор венозной крови. Во вторую подгруппу (контроль Адлер) вошли две обезьяны из питомника Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт”, которые не покидали своего места расположения. Третья подгруппа (контроль (ИМБП)) — это шесть обезьян из Института медико-биологических проблем РАН. Вторая и третья подгруппы животных служили в качестве контроля на протяжении всего эксперимента.

Перед началом эксперимента животные прошли соответствующий карантин и обследование на наличие патогенной микрофлоры и гельминтов. Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123, и директивы № 2010/63/ EU, принятой Европейским парламентом 22 сентября 2010 г. Разрешение на проведение работ было получено от Комитета по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт медицинской приматологии” (Протокол № 11 от 01.11.2017 г.), который создан и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации, и одобрено заключением комиссии по биоэтике ГНЦ РФ — ИМБП РАН / (№ 461 от 04.12.2017 г.).

Однократное облучение обезьян *Macaca mulatta* ионами $^{78}\text{Kг}$ проводили на “Нуклотроне” Лаборатории высоких энергий Объединенного института ядерных исследований (Дубна) [5]. Для облучения животных привозили из питомника обезьян Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт” (Сочи) и Института медико-биологических проблем (Москва). После облучения животных возвращали в исходные условия проживания, которые были аналогичными для обеих групп.

Пучок ядер криптона направлялся в область головы с затылочной части черепа. Основная часть потока облучения приходилась на гиппокамп, т.е. были облучены только локальные участки мозга. Пучок в месте облучения обезьян был узким и имел в сечении форму, близкую к эллипсу. Расчет средней линейной передачи энергии (ЛПЭ) ядер криптона проводился с учетом затылочной кости мозга толщиной 0.5 см и плотностью 1.85 г/см³ и составил 260 кэВ/мкм. Поток ядер криптона, необходимый для создания в мозге поглощенной дозы 1 Гр, равен $2.4 \cdot 10^6$ ядер/см². Измерение потока частиц, прошедших через мозг обезьян, осуществлялось

с помощью пролетной ионизационной камеры, предварительно градуированной в этом пучке ядер криптона по показаниям сцинтилляционного счетчика, устанавливаемого на пучок. Чувствительность камеры к ядрам $^{78}\text{Kг}$ с энергией 2.3 ГэВ/н составила 14.0 ядра на 1 импульс камеры. Фоновый счет камеры составлял менее 1%. В ходе облучения через мозг обезьян прошло от $7.365 \cdot 10^6$ до $8.336 \cdot 10^6$ ядер. Длительность облучения обезьян составила 5–8 мин. Локальная доза облучения составила около 3 Гр. Доза усредненная по всему мозгу обезьян, оценивается примерно в 0.15 Гр (расчетная масса мозга обезьян считалась равной 100 г).

Отдельно проведено облучение лимфоцитов крови *in vitro* у трех контрольных обезьян *Macaca mulatta* на пучке фазотрона Медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ протонами с исходной энергией 170 МэВ в дозах 1, 2, 3, 4 и 5 Гр при мощности 0.4 Гр/мин.

Забор венозной крови у животных выполняли в разные сроки после облучения головы обезьян. Через 1, 40, 96 и 460 сут после облучения забор крови из вены осуществляли у всех облученных животных, а на 7-е и 350-е сутки — только у обезьяны № 383, которая обитала в виварии ИМБП. Во время взятия крови обезьяны находились под наркозом. Анестезия использовалась на всех сроках забора крови у обезьян. Транквилизацию обезьян проводили с помощью комбинации препаратов “Ксила” (Interchemie, Голландия), 0,1 мл/кг веса животного, и “Золетил” (Virbac, Франция), 0,05 мл/кг веса животного. Венозную кровь животных отбирали в специальные одноразовые стерильные вакуумные пробирки с гепарином (BD Vacutainer® Plus). Образцы крови доставляли в Лабораторию радиационной биологии (г. Дубна), где осуществлялись все процедуры по культивированию, приготовлению цитогенетических препаратов и анализу хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta*. Лимфоциты культивировали в соответствии со стандартным протоколом [6] с некоторой модификацией методики. Использовали полную питательную среду RPMI-1640 с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 2% антибиотика. Для стимуляции клеток к вступлению в митоз добавляли в полную питательную среду 4% фитогемагглютина (РНА, Sigma-Aldrich) и 0.05% форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА, Sigma-Aldrich). Инкубацию клеточной культуры осуществляли в атмосфере с содержанием 5% CO_2 .

Для накопления клеток на стадии метафазы использовали ингибитор образования веретена деления колцемид, который добавляли за 2 ч до фиксации в конечной концентрации 0.12 мкг/мл. После осаждения лимфоцитов центрифугированием проводили гипотоническую обработку 0.075 моль/л раствором КС1. Клетки фиксировали свежеприготовленной и охлажденной до -20°C смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Классификацию хромосомных нарушений проводили по общепринятой методике, рекомендованной МАГАТЭ [7].

Препараты лимфоцитов готовили раскапыванием клеточной суспензии на влажные стекла с последующим их окрашиванием свежеприготовленным 3%-ным раствором Гимза на фосфатном буфере. Для анализа лимфоцитов общепринятым метафазным методом использовали стандартные световые микроскопы (Olympus CX41). В анализ включали все встреченные полные метафазы с числом хромосом 42 ± 1 и хорошим разбросом хромосом. Неполные метафазы и метафазы с множественными наложениями из анализа исключались. Учитывали все виды хромосомных aberrаций, выявляемых без проведения кариотипирования. При анализе хромосомных нарушений к дицентрику и центрическому кольцу относили по одному сопутствующему фрагменту.

У животных проанализированы цитогенетические показатели через 1, 7, 40, 96 и 460 сут после облучения головы обезьяны ионами $^{78}\text{Kг}$. Для каждого образца просчитывали от 500 до 1000 клеток. Общее количество клеток, просчитанных для контрольных обезьян, составило более 11000 клеток, а для облученных — более 19000. Отдельно было просчитано более 4000 клеток крови, облученной *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ.

Гематологический анализ крови обезьян проводили на анализаторе фирмы Beckman 5 diff, USA.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel. Данные на графиках и таблицах представлены как среднее арифметическое результатов, полученных для каждого животного в группе по всем исследуемым параметрам. Частоту хромосомных нарушений рассчитывали на 100 клеток. Статистическая неопределенность измеренного числа хромосомных aberrаций была рассчитана с учетом количества проанализированных метафаз как $\sqrt{(n/N)}$, где n — общее количество выявленных aberrаций, а N — общее количество проанализированных клеток. Результаты гематологических

Таблица 1. Хромосомные нарушения в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta***Table 1.** Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys

Показатель	Число обезьян	Просчитано клеток	Клетки с аберрациями, %	Число аберраций, на 100 клеток	Аберрации, на 100 клеток	
					хроматидные	хромосомные
Контроль со стрессом (транспортировка Адлер–Москва)	4	4000	1.48 ± 0.12	1.48 ± 0.12	0.95 ± 0.10	0.53 ± 0.07
Контроль (Адлер)	2	2400	1.92 ± 0.14	2.08 ± 0.14	1.46 ± 0.12	0.63 ± 0.08
Контроль (ИМБП)	6	4730	1.72 ± 0.13	1.77 ± 0.13	1.27 ± 0.11	0.50 ± 0.07
Обобщенный контроль	12	11130	1.67 ± 0.13	1.73 ± 0.13	1.20 ± 0.11	0.53 ± 0.07

и физиологических показателей представлены как средние значения экспериментов ± стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ хромосомных аберраций у контрольных животных разных подгрупп не выявил существенных отличий по их уровню и спектру. Это позволило обобщить данные по спонтанному уровню хромосомных нарушений, которые в дальнейшем использовали для сравнения выхода хромосомных аберраций у облученных обезьян (табл. 1).

Данные цитогенетического анализа хромосомных нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* контрольной группы выявили низкий уровень хромосомных аберраций. Среднее количество клеток с хромосомными нарушениями для всего исследованного контроля не превышало 1.67%. В аберрантных клетках, как правило, регистрировалось не более одной аберрации. Сопоставимые данные по анализу спонтанного уровня хромосомных аберраций в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* были получены в работе [8]. Основную долю встреченных хромосомных нарушений (до 72%) составляли аберрации хроматидного типа. Среди них преобладающими оказывались фрагменты.

Количество клеток с дицентриками и центрическими кольцами, встреченных при анализе контрольных образцов, не превышало 0.02 на 100 клеток. Уровень спонтанно возникающих дицентриков в лимфоцитах крови человека, являющийся нормой по рекомендации МАГАТЭ [7], составляет 1 на 1000 клеток. Наблюдаемые в лимфоцитах крови контрольных обезьян *Macaca mulatta* показатели низкого уровня как общего количества возникающих хромосомных аберраций, так и дицентриков, являющихся маркерами радиационного воздействия,

коррелируют с аналогичными показателями, характерными для лимфоцитов крови человека, не подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения. При цитогенетическом анализе также проводилась оценка модального числа хромосом в клетках. По литературным данным кариотип обезьяны *Macaca mulatta* представлен 42 хромосомами [9]. У всех просчитанных образцов модальным числом хромосом являлось 42. При этом как у контрольных, так и у облученных обезьян были встречены полиплоидные клетки. В среднем их уровень не превышал 1–3%.

Проведенный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся воздействию ускоренных ионов ^{78}Kr в дозе около 3 Гр, позволил выяснить, что средний уровень аберрантных клеток у локально облученных обезьян через сутки после облучения вырос почти в 2.7 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Спустя 7 сут после облучения головы обезьян ионами криптона количество клеток и общее число хромосомных нарушений снизилось на 10–15% и составило 3.9 и 4.6 соответственно, превышая контрольный уровень в 2.3 и 2.6 раза.



Рис. 1. Данные цитогенетического анализа лимфоцитов периферической крови обезьян, подвергшихся локальному воздействию ускоренных ионов ^{78}Kr в дозе 3 Гр в разные сроки наблюдений.

Fig. 1. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of monkeys locally exposed to 3 Gy of accelerated ^{78}Kr ions at different observation times.

Основную долю aberrаций представляли хроматидные и хромосомные фрагменты до 80%. На 7-е и 350-е сутки исследования данные представлены только по одной обезьяне, к сожалению, не было возможности провести исследование у остальных облученных животных. Индивидуальные показания обезьян на каждом сроке исследования представлены в табл. 2.

При исследовании хромосомных нарушений в первые сроки после облучения (1-е и 7-е сутки) практически у каждой обезьяны были встречены клетки с многочисленными aberrациями в одной клетке (от 2 до 5). В дальнейшем вплоть до 96-х суток происходит снижение клеток с хромосомными aberrациями и уменьшение количества клеток с множественными aberrациями. В отдаленные сроки исследования встречаются только единичные клетки с двумя aberrациями. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными по снижению уровня хромосомных нарушений у человека, проанализированными после инцидента с тотальным воздействием γ -излучений в разных дозах [10].

К 460-м суткам исследования средний уровень хромосомных нарушений сохранялся повышенным, превышая показатели необлученного контроля в 1.8 раза. При этом отмечается незначительное повышение среднего уровня хромосомных нарушений по сравнению с предыдущим сроком исследования. Значительный вклад в это повышение вносили две обезьяны (42118 и 42031), у которых на протяжении всего эксперимента наблюдался более высокий уровень клеток с хромосомными нарушениями по сравнению с остальными облученными обезьянами (табл. 2). Стоит отметить, что у остальных обезьян в отдаленные сроки после облучения отсутствовали клетки с множественными aberrациями, тогда как у двух обезьян (42118 и 42031) на каждом сроке исследования до 5% клеток от общего числа aberrантных клеток были клетками с двумя и более aberrациями, и данное соотношение сохранялось на протяжении всего исследуемого срока. Сохранение повышенного уровня структурных повреждений хромосом наблюдали в более ранних работах на обезьянах *Macaca mulatta*. Было показано сохранение в костном мозгу животных, переживших общее разовое и длительное γ -облучение в дозе 410-650 Р, повышенного уровня спустя 9-13 лет [11, 12]. А повышенный уровень хромосомных транслокаций в лимфоцитах крови облученных обезьян сохранялся через 28 лет после облучения [13].

Результаты анализа дицентриков и центрических колец показали, что через 1 сут после локального облучения ионами криптона средний уровень дицентриков и центрических колец вырос в более чем 11 раз по сравнению с контролем и оставался повышенным на протяжении всех сроков исследования. К 460-м суткам исследования маркеры радиационного воздействия все еще превышали показатели контрольного уровня. Уровень хроматидных и хромосомных фрагментов к этому сроку также снизился. Вместе с тем на 460-е сутки отмечено увеличение числа хромосомных фрагментов по сравнению с предыдущим сроком наблюдений с 0.30 до 0.75 на 100 клеток.

Проведенное исследование позволило оценить динамику снижения клеток с хромосомными aberrациями. В течение первых трех месяцев после локального облучения головы обезьян уровень хромосомных aberrаций снизился на 40%. Примечательно, что даже после локального облучения головы обезьян уровень дицентриков и центрических колец сохраняется повышенным на протяжении всего периода наблюдения без какой-либо тенденции к их снижению. Аналогичные результаты по сохранению хромосомных нарушений наблюдались в лимфоцитах детей и подростков, проживавших на радиоактивно загрязненных областях в течение 17 лет после Чернобыльской аварии [14].

Снижение общего числа хромосомных aberrаций, по всей видимости, связано с элиминацией из циркулирующей крови клеток с нестабильными хромосомными aberrациями. Сохранение в лимфоцитах крови повышенного по сравнению с контролем уровня дицентриков и иных типов хромосомных aberrаций через 460 суток после облучения головы обезьян *Macaca mulatta*, скорее всего, указывает на существование фракции лимфоцитов с разной продолжительностью жизни, которая может варьировать от 15 дней до 6 лет [15].

Метод биологической дозиметрии, основанный на оценке хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови, зарекомендовал себя надежным показателем, поскольку количество aberrаций, вызванных ионизирующим излучением, соответствует поглощенной дозе. Исследование дозовой зависимости выхода хромосомных aberrаций, регистрируемых в лимфоцитах периферической крови обезьян, является важной задачей с целью определения поглощенной дозы в дальнейших планируемых модельных экспериментах на обезьянах *Macaca mulatta* при подготовке к полетам за пределами магнитосферы Земли и сопоставлении

полученных данных с имеющимися таковыми для человека.

Ранее в нашей лаборатории получены результаты цитогенетического исследования клеток человека после облучения протонами разных энергий [16–18]. Данные после воздействия протонов с энергией 170 МэВ и 1 ГэВ на лимфоциты человека и обезьян при облучении крови *in vitro* представлены на рис. 2. Характер дозовой зависимости по выходу клеток с хромосомными aberrациями после воздействия

протонов на лимфоциты обезьян имеет линейный вид вплоть до 4 Гр с последующим отклонением от линейности и выходом на уровень насыщения. Для общего числа хромосомных aberrаций наблюдается степенная линейно-квадратичная зависимость от дозы вследствие вклада aberrаций двухударного типа.

Основной тип хромосомных aberrаций, выявленных в лимфоцитах крови обезьян после облучения протонами с энергией 170 МэВ при анализе стандартным метафазным методом, составили

Таблица 2. Хромосомные нарушения в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* на разные сроки после облучения головы обезьян ионами криптона

Table 2. Chromosomal abnormalities in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys at different times after irradiation of the monkeys' heads with krypton ions

№ исследуемых обезьян	Срок исследования, сутки	Просчитано клеток	Клетки с aberrациями, %	Количество aberrаций, на 100 кл.	Дисцентрики и кольца, на 100 кл.	Фрагменты, на 100 кл.
42118	1	1000	5.20	5.80	0.40	2.50
42031		1000	6.00	7.30	0.50	5.00
41930		1000	3.70	3.90	0	2.80
42090		1000	3.70	4.40	0.20	2.60
383		1000	4.00	4.00	0	2.20
Среднее за 1 сут		5000	4.52 ± 0.21	5.08 ± 0.22	0.22 ± 0.05	3.02 ± 0.17
383	7	1000	3.90 ± 0.20	4.60 ± 0.21	0.30 ± 0.05	3.20 ± 0.18
42118	40	1000	3.80	3.90	0.40	2.20
42031		1000	3.50	3.70	0.40	2.50
41930		1000	2.20	2.20	0.30	1.20
42090		1000	2.40	2.50	0.20	1.60
383		1000	2.90	3.10	0.10	1.70
Среднее за 40 сут		5000	2.96 ± 0.17	3.08 ± 0.17	0.28 ± 0.05	1.84 ± 0.14
42118	96	1000	2.70	2.90	0.20	1.90
42031		1000	3.50	3.80	0.40	2.50
41930		1000	2.50	2.70	0.10	1.70
42090		1000	2.70	2.80	0.40	2.00
383		1000	2.10	2.30	0	1.80
Среднее за 96 сут		5000	2.70 ± 0.16	2.90 ± 0.17	0.22 ± 0.05	1.98 ± 0.14
383	350	690	2.61 ± 0.16	2.61 ± 0.16	0.14 ± 0.03	1.16 ± 0.09
42118	460	1000	4.87	5.23	0.36	3.97
42031		883	2.94	3.17	0.45	1.81
41930		1000	2.50	2.60	0.20	1.70
42090		1000	2.20	2.30	0.30	1.80
383		1000	2.60	2.80	0.40	1.90
Среднее за 460 сут		4437	3.00 ± 0.18	3.20 ± 0.17	0.32 ± 0.05	2.24 ± 0.13

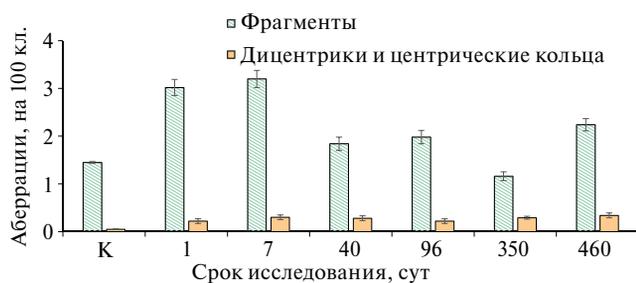


Рис. 2. Распределение дидцентриков, центрических колец и фрагментов в разные сроки наблюдения.

Fig. 2. Distribution of dicentric (Dic), centric rings (Rc), and fragments at different observation times.

дидцентрики (до 35–40% от общего числа аберраций). Данные цитогенетического анализа хромосомных нарушений после облучения лимфоцитов крови *in vitro* свидетельствуют о широком спектре возникающих хромосомных аберраций, увеличении их выхода с увеличением дозы лучевого воздействия и отсутствии существенных количественных различий этих показателей у исследуемых обезьян.

Несомненно, полученные результаты представляют большой интерес. Как видно (рис. 3), кривые по частоте образования клеток с хромосомными аберрациями и общему числу аберраций хромосом практически идентичны, что подтверждает одинаковую радиочувствительность клеток человека и обезьян. В литературе имеются фрагментарные сведения о схожей радиочувствительности обезьян и человека после действия рентгеновского или γ -излучения [19].

В ходе проведенного исследования были также проанализированы гематологические, биохимические, молекулярные и поведенческие реакции облученных животных. В результате локального облучения головы по ряду вышеперечисленных показателей были обнаружены изменения некоторых параметров. Данные этого исследования опубликованы в работе [20]. Следует отметить, что все показатели находились в пределах референсных значений для данного вида животных. К 163-м суткам зафиксировано возвращение до контрольных значений по основным гематологическим показателям (например, эритроцитам). Вместе с тем уровень лимфоцитов оставался повышенным на всех сроках наблюдения (рис. 4) и у двух обезьян превышал референсные значения. Возможно, незначительные колебания гематологических показателей связаны с реакцией на облучение мозга и,

как следствие, возникновением местной воспалительной реакции тканей.

На протяжении всего эксперимента вес как контрольных, так и облученных обезьян постепенно увеличивался. У животных выявлена тенденция к более быстрому набору массы у облученных обезьян, что, возможно, может свидетельствовать о нарушении метаболизма (рис. 5).

По поведенческим реакциям у некоторых облученных животных сформировались устойчивые отклонения от стандартного поведения обезьян. Наиболее выраженные патологии зафиксированы у двух самцов, которые проявлялись в виде эпизодических запрокидываний головы вверх и нехарактерных маятниковых движений тела [21]. Данные отклонения проявились в более поздние сроки наблюдения (460-е сутки) и сохранялись вплоть до 5 лет после облучения. Примечательно, что ряд авторов также отмечают влияние облучения на поведенческие реакции у грызунов и нарушения гиппокамповозависимых форм поведения и обеспечивающих их нейрохимических и молекулярных механизмов [22–24]. В проведенном исследовании обращает на себя внимание возможная корреляция между поведенческими дисфункциями и повышенным уровнем хромосомных аберраций (в том числе дидцентриков и центрических колец), который был обнаружен после локального облучения у одной обезьяны (42031) на протяжении всего эксперимента.

Результаты цитологического анализа после локального облучения головы обезьян ускоренными ионами криптона указывают на то, что поврежденные лимфоциты элиминируются частично, и продолжают циркулировать в кровеносном русле в течение длительного времени после облучения. Возможно, часть из них депонируются в лимфосистеме и выходят в кровеносное русло в поздние сроки наблюдения [25]. Примечательно, что в большинстве работ, посвященных ретроспективной оценке полученных доз в результате различных инцидентов, указывается на экспоненциальное снижение уровня хромосомных аберраций (дидцентриков) со временем [26]. Вместе с тем полученные данные демонстрируют эффекты, отличные от стандартных типов облучений, и в ходе даже локального облучения ускоренными ионами могут формироваться более стойкие повреждения в организме животных, которые проявляются в повышении уровня хромосомных аберраций и в отклонении поведенческих реакций в отдаленные сроки наблюдения.

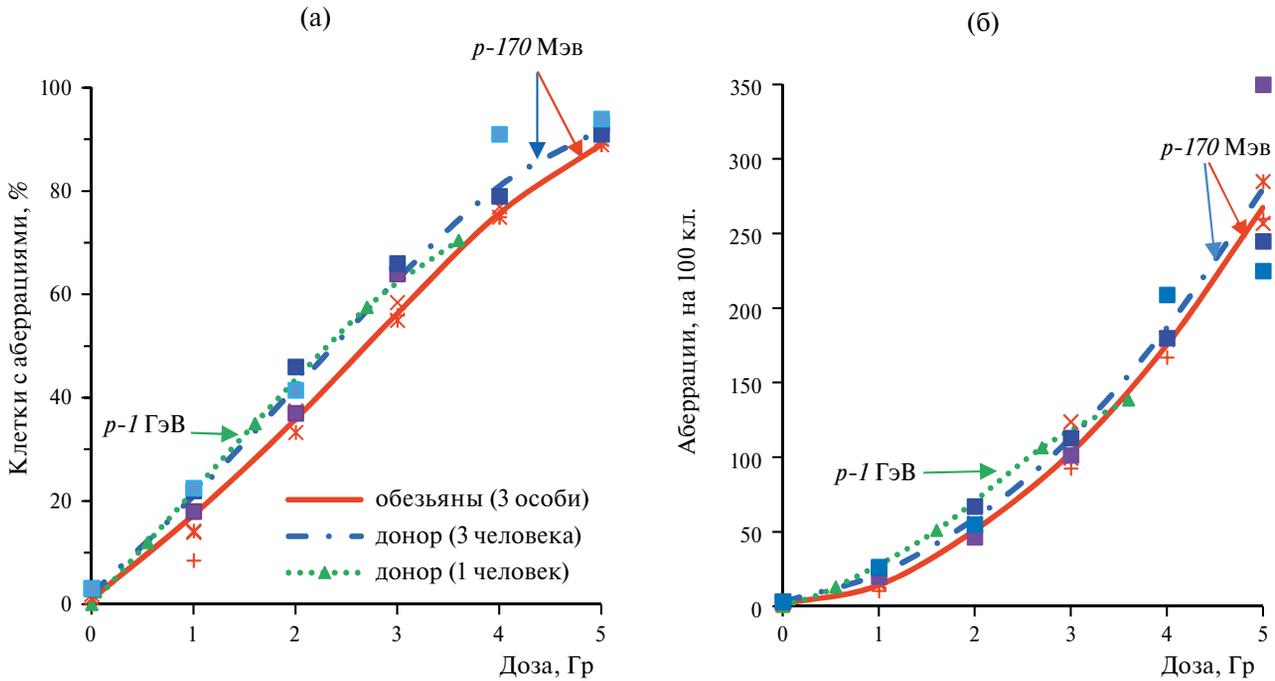


Рис. 3. Дозовая зависимость частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями (а) и общего числа хромосомных aberrаций (б) после облучения образцов цельной крови обезьян *Macaca mulatta* и человека протонами 170 МэВ (кривые красного и синего цвета) и 1 ГэВ (кривая зеленого цвета). Прерывистыми линиями представлены усредненные данные по лимфоцитам крови человека, сплошной линией представлены усредненные данные по лимфоцитам крови обезьян. Незакрашенные символы (квадратики и кружки) — данные для каждого отдельного донора (человека), покрашенные символы (треугольники) — данные для каждой особи обезьян.

Fig. 3. Dose dependence of the formation frequency of lymphocytes with chromosomal aberrations (a) and the total number of chromosomal aberrations (b) after irradiation of whole blood samples of *Macaca mulatta* monkeys and humans with 170 MeV (the red and blue curves) and 1 GeV (the green curve) protons. The dashed and solid lines represent the average data for human and monkey blood lymphocytes, respectively. The unfilled symbols (squares and circles) represent the data for each individual human donor; the filled symbols (triangles), for each individual monkey.

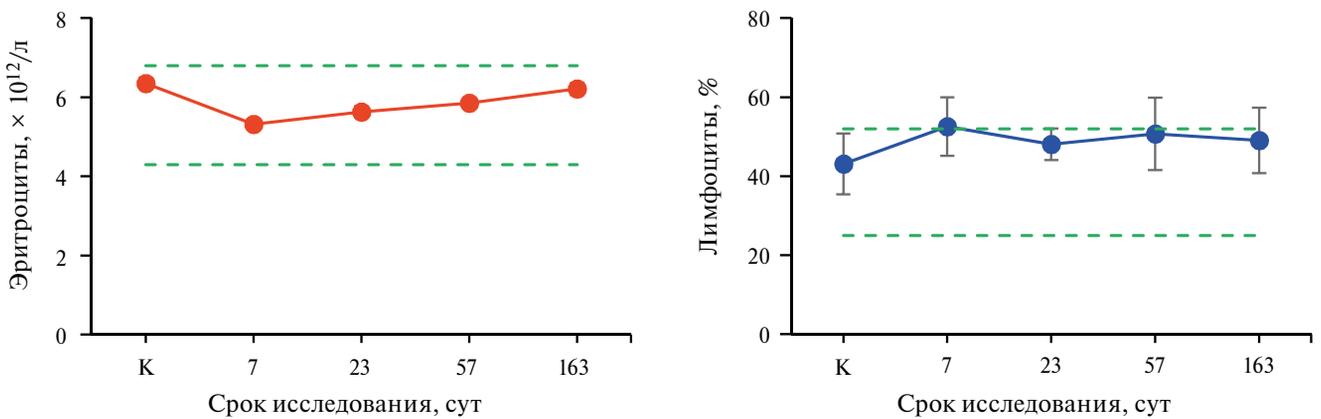


Рис. 4. Уровень эритроцитов и лимфоцитов в разные сроки наблюдений после локального облучения головы обезьян *Macaca mulatta*. Прерывистыми линиями обозначены референсные значения.

Fig. 4. Levels of red blood cells and lymphocytes at different observation times after local irradiation of the head of *Macaca mulatta* monkeys. The dashed lines indicate the reference values.

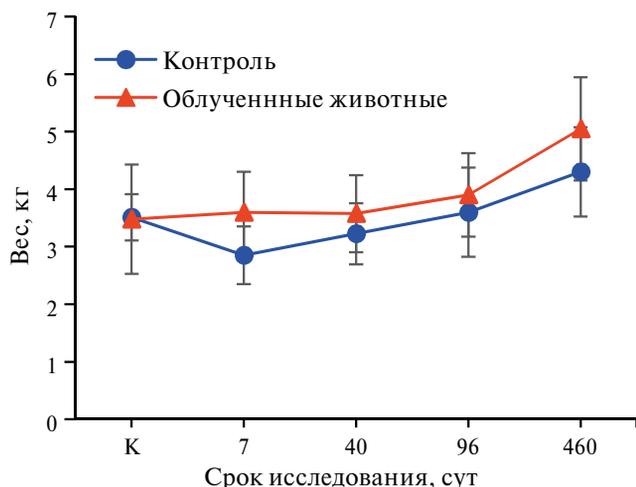


Рис. 5. Динамика массы тела облученных и контрольных животных.

Fig. 5. Dynamics of the body weight of irradiated and control animals.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови обезьян *Macaca mulatta* после локального воздействия ускоренных ионов криптона ^{78}Kr в дозе 3 Гр на область гиппокампа животных выявило сохраняющуюся хромосомную нестабильность в лимфоцитах периферической крови обезьян *Macaca mulatta* на протяжении 460 суток после облучения. Наибольший выход хромосомных aberrаций отмечен через сутки после облучения с последующим их снижением на протяжении всего исследуемого срока. В отдаленные сроки у ряда облученных животных отмечались отклонения от стандартного поведения обезьян. У одного животного отмечается корреляция поведенческой дисфункции и повышенного уровня хромосомных aberrаций.

На основе данных, полученных после облучения *in vitro* лимфоцитов крови обезьян *Macaca mulatta* протонами с энергией 170 МэВ в дозах 1–5 Гр, построены кривые зависимости доза–эффект по выходу хромосомных повреждений. Сопоставление данных хромосомных нарушений, обнаруженных в лимфоцитах крови обезьян и человека после облучения лимфоцитов крови *in vitro* протонами с энергией 170 МэВ в исследованных дозах не выявило существенных отличий, что указывает на одинаковую радиочувствительность исследуемых объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам ГНЦ РФ ИМБП РАН и Института медицинской приматологии ФГБУ “НИЦ “Курчатовский институт”, осуществлявшим клиническое, научное и организационное обеспечение эксперимента на приматах, специалистам Медико-технического комплекса для протонной лучевой терапии Г.В. Мицыну, А.Г. Молоканову, С.В. Швидкому, обеспечившим дозиметрию и облучение обезьян протонами на фазотроне ЛЯП ОИЯИ, и сотрудникам ЛРБ ОИЯИ Г.Н. Тимошенко, В.А. Крылову и Е.Е. Павлику, осуществившим на нуклотроне ЛФВЭ ОИЯИ облучение обезьян ускоренными ионами криптона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы ЛРБ ОИЯИ 05-7-1077-2009 и базовой темы РАН 65.2, FMFR-2024-0036.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Parihar V.K., Allen B., Tran K.K. et al. What happens to your brain on the way to Mars. *Sci. Advances*. 2015;1(4):e1400256. <http://doi.org/10.1126/sciadv.1400256>
- Parihar V.K., Allen B.D., Caressi C. et al. Cosmic radiation exposure and persistent cognitive dysfunction. *Sci. Rep.* 2016;6:34774. <http://doi.org/10.1038/srep34774>
- Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К вопросу о радиационном барьере при пилотируемых межпланетных полётах. *Вестн. РАН*. 2017;87(1):65–69. <https://doi.org/10.7868/S0869587317010030> [Grigor'ev A.I., Krasavin E.A., Ostrovsky M.A. The problem of the radiation barrier during piloted interplanetary flights. *Herald of the Russian academy of sciences*. 2017;87(1): 63–66. <https://doi.org/10.1134/S1019331617010014> (In Russ.)]
- Meigs L., Smirnova L., Rovida C. et al. Animal testing and its alternatives — the most important omics is economics. *ALTEX*. 2018;35(3):275–305. <http://doi.org/10.14573/altex.1807041>
- Балдин А.А., Брандова В., Бутенко А.В. и др. Методика облучения мозга приматов пучком ядер криптона на нуклотроне ЛФВЭ. *Письма в ЭЧАЯ*. 2019;16(4(223)):302–309. [Baldin A. A., Bradnova V., Butenko A. V. et al. Method for irradiation of the brain of primates by the ^{78}Kr beam extracted from nuclotron at LNER. *Particles and Nuclei, Letters*. 2019;16(4(223)):302–309. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s1547477119040071>
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960;20(3):613–616. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)

7. International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Report №. 405. Vienna, 2001.
8. Косиченко Л.П., Барская В.С., Торва Р.А. Цитогенетическое исследование лимфоцитов костного мозга и периферической крови обезьян при длительном гамма-облучении. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1987;104(7): 85–87. [Kosichenko L.P., Barskaia V.S., Torva R.A. Cytogenetic study of the bone marrow and peripheral blood lymphocytes in monkeys in long-term gamma irradiation. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 1987;104(7):85–87. (In Russ.)]
9. Chiarelli B. Comparative morphometric analysis of primate chromosomes. II. The chromosomes of genera *Macaca*, *Papio*, *Theropithecus* and *Cercocebus*. *Caryologia*. 1962;15(2):401–420. <https://doi.org/10.1080/00087114.1962.10796068>
10. Ramalho A.T., Curado M.P., Natarajan A.T. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat. Res.* 1995;331(1):47–54. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00049-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00049-0)
11. Косиченко Л.П. Отдаленный цитогенетический эффект острого облучения у обезьян. Сообщение I. Длительное сохранение поврежденных хромосом в клетках костного мозга обезьян. *Генетика*. 1972;8(3): 105–113. [Kosichenko L.P. Otdalennyj citogeneticheskij effekt ostrogo oblucheniya u obez'yan. Soobshchenie I. Dlitel'noe sohranenie povrezhdenij hromosom v kletkah kostnogo mozga obez'yan. *Genetika*. 1972;8(3): 105–113. (In Russ.)]
12. Косиченко Л.П. Структурные мутации хромосом в клетках костной мозги обезьян в отдаленные сроки после длительного повторного облучения. *Генетика*. 1973;9(1):134–142. [Kosichenko L.P. Strukturnye mutacii hromosom v kletkah kostnoj mozga obez'yan v otdalennye sroki posle dlitel'nogo povtornogo oblucheniya. *Genetika*. 1973;9(1):134–142. (In Russ.)]
13. Lucas J.N., Hill F.S., Burk C.E. et al. Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996;70(3): 309–18. <https://doi.org/10.1080/095530096145049>
14. Михайлова Г.Ф. Анализ результатов цитогенетических исследований населения, проживающего на радиоактивно-загрязненных территориях после чернобыльской аварии. Автореф. дис. на соискание ученой степени докт. биол. наук. Обнинск, 2007. 32 с. [Mihajlova G.F. Analiz rezul'tatov citogeneticheskikh issledovanij naseleniya, prozhivayushchego na radioaktivno-zagryaznennyh territoriyah posle chernobyl'skoj avarii. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni dokt. biolog. nauk. Obninsk, 2007. 32 p. (In Russ.)]
15. Гаврилов О.К., Чертков И.Л., Козинец Г.И. и др. Нормальное кроветворение и его регуляция. М.: Медицина, 1976. 543 с. [Gavrilov O.K., Chertkov I.L., Kozinec G.I. i dr. Normal'noe krovetvorenje i ego reguljacija. M.: Medicina, 1976. 543 p. (In Russ.)]
16. Репин М.В. Стабильные и нестабильные хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека, индуцируемые излучениями с разными ЛПЭ. Автореферат дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Обнинск, 2000. 18 с. [Repin M.V. Stabil'nye i nestabil'nye hromosomnye aberracii v limfocitah krovi cheloveka, induciруемые izluchenyami s raznymi LPE. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni kand. biolog. nauk. Obninsk, 2000. 18 p. (In Russ.)]
17. Репин М.В., Говорун Р.Д., Красавин Е.А. Хромосомные нарушения в лимфоцитах человека при действии ускоренных заряженных частиц. *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2002;33(3):746–747. [Repin M. V., Govorun R.D., Krasavin E.A. Chromosomal damages in the human lymphocytes induced by accelerated charged particles. *Physics of Elementary Particles and Atomic Nuclei*. 2002;33(3):746–747. (In Russ.)]
18. Говорун Р. Д., Депенас-Каминьска М., Зайцева Е.М. и др. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований. *Письма в ЭЧАЯ*. 2006;3(1(130)):92–100. [Govorun R.D., Deperas-Kaminska M., Zaitseva E.M. et al. The study of chromosomal damages in human cells on irradiation with the therapeutic proton beam of the Joint Institute for Nuclear Research's phasotron. *Particles and Nuclei, Letters*. 2006;3(1):92–100. (In Russ.)]
19. Колюбаева С.Н. Хромосомные aberrации, микроядра и апоптоз в лимфоцитах при радиационных воздействиях и других патологических состояниях. Автореферат дис. на соискание ученой степени доктора биол. наук. Санкт-Петербург, 2010. 261 с. [Kolyubaeva S.N. Hromosomnye aberracii, mikroyadra i apoptoz v limfocitah pri radiacionnyh vozdeystviyah i drugih patologicheskikh sostojaniyah. Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoj stepeni doktora biolog. nauk. Sankt-Peterburg, 2010. 261 p. (In Russ.)]
20. Штемберг А.С., Клоц И.Н., Беляева А.Г. и др. Гематологические, биохимические и молекулярные эффекты облучения головы обезьян ядрами криптона высоких энергий. *Авиакосм. и экол. медицина*. 2020;54(1):38–45. [Shtemberg A.S., Klots I.N., Belyaeva A.G. et al. Hematological, biochemical and molecular effects of primate's head irradiation with high-energy krypton nuclei. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2020;54(1):38–45. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-1-38-45>
21. Клоц И.Н., Кошлань И.В., Тимошенко Г.Н. и др. Отдаленные последствия облучения обезьян ядрами криптона высоких энергий. В кн.: VIII Съезд по радиационным исследованиям, Москва, 2021. Тез. Докл. Дубна: ОИЯИ, 2021. С. 247. [Klots I.N., Koshlan I.V., Timoshenko G.N. et al. Otdalennye posledstviya oblucheniya obez'yan yadrami kriptona vysokih energij. VIII Congress on radiation research, Moscow, 2021. Abstracts. Dubna: JINR, 2021 P. 247 (In Russ.)]
22. Britten R.A., Jewell J.S, Miller V.D. et al. Impaired Spatial Memory Performance in Adult Wistar Rats Exposed to Low (5–20 cGy) Doses of 1 GeV/n ⁵⁶Fe Particles. *Radiat. Res.* 2016;185(3):332–7. <https://doi.org/10.1667/RR14120.1>
23. Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B. Heavy particle irradiation, neurochemistry and behavior: thresholds, dose-response curves and recovery of function. *Adv. Space Res.* 2004;33(8):1330–1333. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2003.09.051>

24. Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B. A Longitudinal study of operant responding in rats irradiated when 2 months old. *Radiat. Res.* 2005;164(4):552–5. <http://dx.doi.org/10.1667/rr3349.1>
25. Толстых Е. И., Дегтева М. О., Возилова А. В. и др. Подходы к цитогенетической оценке дозы при радиационном воздействии на лимфоидную ткань кишечника. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2021;61(4):339–52. [Tolstykh E.I., Degteva M.O., Vozilova A.V. et al. Approaches to the cytogenetic assessment of the dose due to radiation exposure of the gut associated lymphoid tissue. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2021;61(4):339–52. (In Russ.)]. <http://dx.doi.org/10.31857/s0869803121040111>
26. Елисова Т.В. Стабильные и нестабильные aberrации хромосом у человека и других млекопитающих в связи с вопросами биологической дозиметрии. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2008;48(1):14–27. [Elisova T.V. Stable and unstable chromosome aberrations in humans and other mammals in relation to the problems of biological dosimetry. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2008;48(1):14–27. (In Russ.)].

Cytogenetic Violations in Blood Lymphocytes of *Macaca Mulatta* Monkeys in the Long Term after Irradiation with Accelerated Krypton Ions

I. V. Koshlan^{1,2*}, N. A. Koshlan¹, M. D. Isakova¹, Yu. V. Melnikova¹, A. G. Belyaeva³,
A. A. Perevezentsev³, A. S. Stemberg³, I. N. Klotz⁴, T. E. Gvozdik⁴, A. N. Bugay^{1,2}

¹Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

³Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

²Dubna State University, Dubna, Russia

⁴Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

*E-mail: koshlan@jinr.ru

A study has been performed of cytogenetic violations that occur in blood lymphocytes of *Macaca mulatta* monkeys after local exposure of the hippocampal region to accelerated ⁷⁸Kr ions at a dose of 3 Gy. Analysis revealed a low level of chromosomal aberrations in the control group of monkeys. The number of cells with chromosomal aberrations did not exceed 1.67%. The main fraction was chromatid-type aberrations. A cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of monkeys exposed to accelerated krypton ions revealed the maximum level of chromosomal aberrations 24 h after exposure, which exceeded the control level by 2.7 times. By day 96, the number of aberrations decreased 1.7-fold. However, it still exceeded the control level. By 460 days, some animals showed a slight increase in the number of aberrations compared to the previous observation period. In the long term, a number of irradiated animals showed deviations from the standard behavior of monkeys. Data on chromosomal aberrations in blood lymphocytes of monkeys and humans after in vitro irradiation with 170 MeV protons are compared. The relevance of this research is due to the preparation of interplanetary manned flights.

Keywords: monkeys, *Macaca mulatta*, accelerated ions, lymphocytes, dicentrics, biological dosimetry, space radiobiology

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кошлань Игорь Владимирович (Koshlan Igor Vladimirovich), koshlan@jinr.ru,
<https://orcid.org/0009-0000-1591-7418>

Кошлань Наталия Алексеевна (Koshlan Nataliya Alekseevna), nkoshlan@jinr.ru,
<https://orcid.org/0009-0004-9625-1572>

Мария Исакова (Maria Isakova) isakova@jinr.ru,
<https://orcid.org/0009-0002-2780-3914>

Мельникова Юлия Владимировна (Melnikova Iulia Vladimirovna), julesmelnikova@mail.ru,
<https://orcid.org/0009-0000-4731-8874>

Беляева Александра Григорьевна (Belyaeva Alexandra Grigorievna), yasya_bi@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-6348-1938>

Перевезенцев Александр Александрович (Perevezentsev Alexander Alexandrovich), perezx@me.com,
<https://orcid.org/0000-0001-6464-2887>

Штемберг Андрей Сергеевич (Andrey Sergeevich Stemberg), andrei_shtemberg@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-8944-0296>

Клоц Игорь Наумович (Klots Igor Naumovich), igor-imp@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-1025-3127>

Гвоздик Татьяна Евгеньевна (Gvozdik Tat'yana Evgen'evna), teg-adler@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-7171-4500>

Вклад авторов. Все авторы внесли свой вклад в статью и одобрили представленную версию.

Кошлань И.В.: проект, написание и редактирование статьи, планирование и участие в эксперименте, анализ и интерпретация результатов.

Кошлань Н.А.: планирование и участие в экспериментах, анализ, обработка и интерпретация экспериментальных данных, построение таблиц, рисунков, редактирование текста статьи.

Исакова М.Д.: обработка данных эксперимента, редакция и построение таблиц и рисунков, участие в доработке этой рукописи.

Мельникова Ю.В.: участие в эксперименте, редакция таблиц и рисунков, подготовка материалов, участие в доработке этой рукописи.

Беляева А.Г.: концепция исследования, планирование и участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

Перевезенцев А.А.: участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

Штемберг А.С.: администрирование, концепция исследования, планирование и участие в эксперименте, анализ и обработка полученных данных.

Клоц И.Н.: администрирование, планирование и участие в эксперименте, анализ и обработка полученных данных.

Гвоздик Т.Е.: планирование и участие в эксперименте, контроль и наблюдение за животными.

Бугай А.Н.: администрирование и финансовая поддержка, участие в обсуждении и доработке этой рукописи.

Сведения об отсутствии или наличии конфликта

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

The authors declare no conflicts of interests.