



Федеральное агентство научных организаций
Российская академия наук

ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОФИЗИКА

7–9 февраля 2018 года

Том II

БИОТЕХНОЛОГИЯ



ПУЩИНО
2018

**Федеральное агентство научных организаций
Российская академия наук**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук**

**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
БИОФИЗИКА**

7–9 февраля 2018

Том II

Биотехнология

**Издательство Синхробук (Synchrobook™)
Пушино 2018**

Теоретическая и экспериментальная биофизика. Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика». Том II «Биотехнология». – Пущино: Синхробук (Synchrobook TM), 2018. – 25 с.
ISBN 978-5-91874-022-4

Под ред. чл.-корр. РАН Иваницкого Г.Р.

Настоящий сборник составлен по материалам, отражающим наиболее значимые результаты научных исследований, представленных сотрудниками ИТЭБ РАН в 2018 г. на ежегодной отчетной конференции в направлении «Биотехнология». В сборнике представлены достижения ученых ИТЭБ РАН в области разработки инновационных терапевтических подходов для лечения различных заболеваний, а также методов их диагностики, и исследования различных аспектов воздействия ионизирующего излучения на живые объекты.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ, CSA - ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (mPTP). ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТИЯ mPTP. Бабурина Ю. Л., Крестинина О. В., Одинокова И. В., Азарашвили Т. С.	5
ЭКСТРАКТ ГРИБА LECANICILLIUM LECANI ВЫЗЫВАЮТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ЛИМФОЛЕЙКОЗА, НО ПОДАВЛЯЕТ РАДИАЦИОННЫЙ АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ. Бибикова М.В., Спиридонова И.А., А.Ф. Корыстова, Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Шапошникова В.В. , Корыстов Ю.Н.	6
ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМАХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ. Долгих Н.В., Чеканов А.В., Фадеев Р.С., Акатов В.С.	7
ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЕЙ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО (РАДИАЦИОННОГО) ОБЛУЧЕНИЯ. Куликов А.В., Архипова Л.В., Гаврилюк В.Б., Жерелова О.М., Мндлян Е.Ю., Руднев В.Р., Брусков В.И.	8
ИССЛЕДОВАНИЯ СУХИХ ОСТАТКОВ КАПЕЛЬ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА С ПОМОЩЬЮ АСМ. Михеев А.Ю., Морозов В.Н.	9
РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ. Морозов В.Н., Михеев А.Ю., Шляпников Ю.М., Шляпникова Е.А., Николаев А.А. ² , Багдасарян Т.Р., Смирнова Т.Г., Андриевская И.Ю., Ларионова Е.Е., Лядова И.В.	10
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ КАК ОСНОВНОЙ ЭЛЕМЕНТ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ РЕГИСТРАЦИИ. Тихоненко С.А., Дубровский А.В., Мусин Е.В., Ким А.Л., Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.	11
ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА. РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ И КЛЕТОЧНОЙ «МИМИКРИИ». Фадеев Р.С., Евстратова Я.В., Кобякова М.И., Акатов В.С.	12
ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ. Шаталин Ю.В., Шубина В.С., Сантос Э.А.	13
ДЕФОРМАЦИЯ ТКАНЕЙ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ. Буданцев А.Ю.	14
АВТОРЕГУЛЯЦИЯ И КРОССКОНТРОЛЬ В Ca^{2+} - СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ СИГНАЛИЗАЦИИ С УЧАСТИЕМ ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В АДИПОЦИТАХ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ЭТИХ СИСТЕМ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ДИАБЕТЕ 2 ТИПА. Дынник В.В. , Сирота Н.П., Гришина Е.В. ...	15

МЕТФОРМИН УВЕЛИЧИВАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ И УСИЛИВАЕТ ЭКСКРЕЦИЮ С МОЧОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК У КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ. Абдуллаев С.А., Минкабирова Г.М., Карманова Е.Е., Газиев А.И.	16
ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА МЫШАХ, ОБЛУЧЕННЫХ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ IN VIVO. Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М., Сорокина С.С., Романченко С.П., Смирнова Е.Н., Закржевская Д.Т.	17
ОЦЕНКА УРОВНЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ПУЧКА УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА. Кузнецова Е.А., Сирота Н.П., Митрошина И.Ю., Смирнова Е.Н., Романченко С.П., Дюкина А.Р., Заичкина С.И.	21
СООТНОШЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КРОВИ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА. Митрошина И.Ю., Кузнецова Е.А.	22
ВЛИЯНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ПОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В РАННИЕ И ПОЗДНИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ. Сорокина С.С., Мальков А.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н.	23
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА ИОНОВ УГЛЕРОДА ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ. Шемяков А.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Романченко С.П., Сорокина С.С., Дюкина А.Р., Поцелуева М.М.	24

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ CA₂₊ -ЗАВИСИМОЙ, CSA - ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (mPTP). ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТИЯ mPTP.

Бабурина Ю. Л., Крестинина О. В., Одинокова И. В., Азарашвили Т. С.
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: byul@rambler.ru

Общеизвестно, что митохондрии играют ключевую роль в большом количестве физиологических процессов в клетке. Помимо роли силовых станций, производящих энергию для функционирования клеток, митохондрии также участвуют в различных метаболических процессах, процессах транспорта ионов и поддержания ионного гомеостаза в клетке. Еще в 80х годах прошлого века появились данные о связи старения и других дегенеративных процессов с нарушением регуляции апоптоза – программируемой клеточной гибели. Наши исследования посвящены изучению структуры и свойств митохондриальной неспецифической поры mPTP, считающегося начальной стадией апоптоза в клетках. Ранее мы обнаружили, что принимать участие в работе поры могут митохондриальный белок-транслокатор (TSPO), известный ранее как периферический бензодиазепиновый рецептор PBR, и 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстераза (CNP) – фермент, осуществляющий гидролиз 2',3'-циклических нуклеотидов до соответствующих монофосфатов. TSPO представляет собой высокоаффинный связывающий холестерин белок, расположенный во внешней мембране митохондрий. Домен на С-конце TSPO был охарактеризован как cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC). Мы показали, что TSPO через CRAC домен способен принимать участие в функционировании и регуляции mPTP и инициации апоптоза, более того, синтетические лиганды TSPO могут являться фармакологическими регуляторами этих процессов. CNP, являясь интегральным миелиновым белком, присутствует также и в митохондриях, принимая участие в функционировании mPTP. Также было выявлено, что снижение чувствительности митохондрий к открытию mPTP при возрастных изменениях связано с уменьшением количества митохондриальной CNP. Таким образом, обнаружен новый механизм функционирования CNP в митохондриях, согласно которому, CNP, регулируя уровень внутриклеточного/внутримитохондриального 2,3-сАМР, защищает митохондрии от возраст зависимых дегенеративных изменений.

В тоже время, известно, что с возрастом уменьшается выработка нейроэндокринного гормона мелатонина. Нами было показано, что мелатонин способен замедлять индукцию неспецифической поры при старении. Мы предположили, что именно CNP может быть мишенью антиапоптотического воздействия мелатонина в митохондриях. В ходе исследований было показано, что длительный прием мелатонина даже у старых животных способствует сохранению CNP в митохондриях, препятствует открытию mPTP и таким образом улучшает функции митохондрий и снижает чувствительность митохондрий к стрессовым воздействиям. Таким образом, в ходе исследований, обнаружены новые белки – модуляторы митохондриальной неспецифической поры, выявлен новый механизм действия одного из них, CNP, в митохондриях, а также получены результаты, способствующие пониманию механизмов антиапоптотического действия мелатонина.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№17-44-500229-р_а, 17-04-00747-а, 16-04-00927-а) и мегагрантом Правительства Российской Федерации № 14.Z50.0028.

**ЭКСТРАКТ ГРИБА *LECANICILLIUM LECANII* ВЫЗЫВАЮТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК
ЛИМФОЛЕЙКОЗА, НО ПОДАВЛЯЕТ РАДИАЦИОННЫЙ АПОПТОЗ
ТИМОЦИТОВ**

Бибикова М.В.², Спиридонова И.А.², А.Ф. Корыстова¹, Кублик Л.Н.¹, Левитман М.Х.¹, Шапошникова В.В.¹, Корыстов Ю.Н.¹.

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН Пущино, Россия.

²ООО «ВИОРИН», Москва.

e-mail: ykorystov@rambler.ru

Целью работы являлось исследование влияния экстракта гриба *Lecanicillium lecanii* на клетки лимфолейкоза Р388 и радиационный апоптоз тимоцитов крыс. Клетки лимфолейкоза после выращивания 7 суток в брюшной полости мышей DBA2 помещали в питательную среду. Эффекты ингибиторов липоксигеназ оценивали по изменению количества клеток, окраске трипановым синим, повреждению ядер и изменению распределения клеток по содержанию ДНК через 22 ч инкубации. Тимоциты крыс Вистар облучали рентгеновскими лучами в дозе 6 Гр и инкубировали 6 ч в питательной среде. Апоптоз тимоцитов регистрировали по повреждению ядер и фрагментации ДНК. Показано, что экстракт гриба вызывает гибель клеток лимфолейкоза. Гибель клеток обусловлена их апоптозом, о чём свидетельствуют характер повреждения ядер и уменьшение количества ДНК в клетках. Определено IC_{50} для экстракта – 5.5 мкг/мл. Через 6 ч после облучения тимоцитов в дозе 6 Гр доля поврежденных ядер увеличивалась до 67%. Добавление экстракта сразу после облучения снижало процент повреждённых ядер и фрагментацию ДНК в облучённых тимоцитах. Эффект увеличивался с ростом концентрации экстракта и при дозе экстракта 50 мкг/мл процент повреждённых ядер в облучённых тимоцитах падал до контроля (16%), а фрагментация ДНК снижалась до уровня ниже контрольного. IC_{50} экстракта по снижению повреждения ядер равна 6 мкг/мл.

Одним из существенных факторов, осложняющих успешную радиотерапию опухолей, является пострadiационный иммунодефицит, обусловленный гибелью лимфоидных клеток. Особенно чувствительны к облучению тимоциты – предшественники зрелых Т-клеток. Облучение инициирует в них гибель по типу апоптоза. В работе показано, что экстракт гриба не только предотвращает апоптоз тимоцитов после облучения, но и вызывает гибель трансформированных лимфоидных клеток. Противоположные эффекты экстракта на опухолевые и нормальные клетки может быть использовано при сочетании химио и радиотерапии опухолей.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМАХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Долгих Н.В., Чеканов А.В., Фадеев Р.С., Акатов В.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: akatov.vladimir@gmail.com

Механизмы резистентности опухолевых клеток к различным повреждающим воздействиям, включая химиотерапевтические и таргетные препараты, характеризуются большим разнообразием и представляют научный и практический интерес. В этой области особое внимание вызывают механизмы защиты опухолевых клеток от TRAIL - опосредованного апоптоза. TRAIL (TNF alpha related apoptosis inducing ligand) является важным цитокином иммунной системы, ответственным за элиминацию трансформированных клеток в организме. Основная функция TRAIL заключается в активации апоптотической гибели трансформированных клеток в результате связывания с рецепторами клеточной гибели, формирования лиганд-рецепторного комплекса, что ведет напрямую к активации эффекторных каспаз, или опосредовано с вовлечением митохондриального пути запуска апоптоза. Ранее нами было установлено, что клетки карциномы кожи человека, линия А431, чувствительные к TRAIL-индуцированному апоптозу в культурах низкой плотности (30 тысяч клеток/кв.см), приобретают обратимую TRAIL-резистентность в плотных, конфлюэнтных (слившихся) культурах (300 тысяч клеток/кв.см). Методами селекции и клонирования нами были выделены две сублинии клеток А431, одна из которых была TRAIL-резистентной (А431-R), а другая TRAIL-чувствительной (А431-S) независимо от плотности культуры. Мы получили полногеномные данные транскриптомов клеток этих линий, взятых из культур с низкой и высокой (конфлюэнт) плотностью, используя HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina) микрочип в ЗАО "Генноаналитика" (Москва), и выполнили анализ изменений сигнальных путей этих клеток в результате приобретения конфлюэнт-зависимой и конфлюэнт-независимой резистентностей к TRAIL – индуцированному апоптозу. Анализ сигнальных путей был проведен методом GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), в котором выполняется анализ всех значимых изменений генов клеток (около 12 000 генов) и учитывает даже небольшие достоверные изменения в генах, входящих в тот или иной сигнальный путь, что может быть более важно, чем значительное усиление одного гена. Обнаружено, что при формировании конфлюэнт-зависимой резистентности клеток А431 выявляется активация большого количества сигнальных путей, связанных с лиганд-рецепторными взаимодействием, с защитным действием RAS и интерферон-зависимой сигнализацией, с изменением цитокин-зависимой сигнализации и с подавлением иммунного противоопухолевого ответа. В противоположность этому, приобретение конфлюэнт-независимой TRAIL-резистентности клетками А431-R ассоциируется с активацией транскрипционных факторов NFE2L2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) и PPARA (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha). Приобретение TRAIL-чувствительности клетками А431-S в конфлюэнтной культуре коррелирует с понижением активности RAS и PPARA сигнальных путей. Выполненный анализ транскриптома указанных клеточных линий в культурах низкой и высокой плотности позволяет оценить значимые и незначимые для TRAIL-резистентности изменения сигнальных путей и формулировать детальные гипотезы механизмов необратимой и обратимой в зависимости от микроокружения резистентности опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу. Экспериментальная проверка этих гипотез позволит направленно оценить различные механизмы резистентности опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства РФ № 14.Z50.31.0028

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЕЙ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО (РАДИАЦИОННОГО) ОБЛУЧЕНИЯ

Куликов А.В., Архипова Л.В., Гаврилюк В.Б., Жерелова О.М., Мндлян Е.Ю., Руднев В.Р.,
Брусков В.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: kulikov@iteb.ru

Изучение повреждающего и летального воздействия ионизирующей радиации на организм, а также поиск способов коррекции данного состояния – актуальные фундаментальные задачи современной радиобиологии, биофизики и иммунологии. Эти задачи тесно связаны с глобальной проблемой современной науки - необходимости обеспечения биологической безопасности человека и животных. В частности в условиях активного развития атомной энергетики и ядерного оружия, и возможностей его использования в террористических актах и военных конфликтах. Решение этих фундаментальных задач необходимо и при разработке новых подходов для их использования в радиационной медицине. Поскольку при облучении в больших дозах наиболее значимым звеном патогенеза развития острой лучевой болезни и летального исхода является миело- и иммунодепрессия, новым перспективным подходом является разработка методик, направленных на коррекцию радиационного поражения центрального органа иммунной системы - тимуса. В предыдущих исследованиях нами была разработана методика трансплантации иммунокомпетентных клеток в иммунологически привилегированные области организма, которая позволяет добиться достоверного снижения летальности и коррекции радиационного поражения. Трансплантация в иммунологически привилегированные области позволяет избежать отторжения трансплантата, однако сопряжена с рядом технических трудностей и возможных косметических дефектов. Учитывая, что в пострadiационный период происходит существенная депрессия иммунной системы, нами была выдвинута гипотеза, что трансплантация иммунокомпетентных тканей даже в неиммунологически привилегированные области может оказаться эффективной. Поскольку облучение, в большинстве случаев, сопряжено с выраженным окислительным стрессом, который, как известно, оказывает пагубное влияние на иммунную систему, в частности на Т-клеточное ее звено.

В докладе будут представлены результаты по новому методу трансплантации клеток тимуса, позволяющему компенсировать радиационно-индуцированное поражение иммунной системы у мышей. Показано, что использование нового подхода приводит к увеличению выживаемости экспериментальных животных после воздействия даже летальных доз облучения.

ИССЛЕДОВАНИЯ СУХИХ ОСТАТКОВ КАПЕЛЬ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА С ПОМОЩЬЮ АСМ.

Михеев А.Ю., Морозов В.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: tammorozova@rambler.ru

Выдыхаемый воздух содержит субмикронные капли легочной жидкости, которые являются, возможно, хорошим источником биомаркеров для диагностирования легочных заболеваний. Мы разработали методы сбора индивидуальных выдыхаемых капель: метод электростатического сбора и импакторный метод. Мы проводили электростатический сбор с помощью специального устройства, в котором сухие остатки от выдыхаемых капель заряжались в коронном разряде и осаждались на заземлённые проводящие поверхности, такие как высокоориентированный пиролитический графит. Мы добились оптимального режима сбора: при скорости 0.15 л/мин и токе около 100 нА эффективность сбора составляла более 90% для всех частиц. Мы также определили оптимальную температуру поверхности и оптимальную температуру резервуара, в который поступает выдыхаемый воздух перед сбором импактором. Температуры составили 50 °С и 20 °С, соответственно.

Полученные образцы сухих остатков выдыхаемых микрокапель были изучены с использованием АСМ. Сухие остатки представляют собой комки неправильной формы с неоднородной структурой, высотой 200-500 нм. Изменения формы сухих остатков при выдерживании во влажной атмосфере и в парах хлороформа, а также при их нагревании позволили сделать выводы о возможном химическом составе (соли – KCl и NH₄Cl, белки, липиды) и строении капель выдыхаемого воздуха. Также, в сочетании с измерением концентрации капель в выдыхаемом воздухе с помощью лазерного счетчика частиц, мы оценили содержание нелетучего материала в выдыхаемом воздухе, которое не превышало 100 пг/л.

Ключевые слова: легочная жидкость, сухие остатки, атомно-силовая микроскопия, выдыхаемый воздух.

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Морозов В.Н.¹, Михеев А.Ю.¹, Шляпников Ю.М.¹, Шляпникова Е.А.¹, Николаев А.А.²,
Багдасарян Т.Р.², Смирнова Т.Г.², Андриевская И.Ю.², Ларионова Е.Е.², Лядова И.В.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²ФГБНУ "ЦНИИТ", Москва.

e-mail: tammorozova@rambler.ru

При поддержке Российского Научного Фонда (грант № 15-15-00086, 2015-2017 гг.) совместно с лабораторией биотехнологии ЦНИИТ (зав. И.В.Лядова) в лаборатории наноструктур и нанотехнологий ИТЭБ РАН было проведено исследование, направленное на разработку массового неинвазивного метода ранней диагностики туберкулеза легких (ТБ), основанного на сборе микрокапель легочной жидкости в выдыхаемом воздухе с последующим анализом собранных проб на присутствие биомаркеров ТБ.

Основные результаты исследования:

- 1) Значительно усовершенствована технология сбора биологических аэрозолей с использованием специально разработанных наночистот, изготовленных по технологии электропрядения с нейтрализацией в газовой фазе. Разработанные наночистоты превосходят по качеству все известные коммерческие и опубликованные образцы [1]. На основе таких чистот созданы дешёвые одноразовые устройства для сбора проб легочной жидкости в выдыхаемом воздухе и устройства для сбора аэрозольных патогенов помещении.
- 2) Усовершенствована методика ультра-чувствительного иммуноанализа, что позволило увеличить точность определения аналитов и измерять относительные титры специфических антител в пробах, содержащих разное количество легочной жидкости. Показано, что чувствительность используемого метода составляет 10^3 - 10^4 белковых молекул [2].
- 3) В рамках проекта выдвинута принципиально новая концепция анализа биомаркеров в отдельных микрокаплях выдыхаемого воздуха.
- 4) Показана принципиальная возможность диагностики ТБ по выдыхаемому воздуху. Образцы выдыхаемого воздуха больных лёгочной формой туберкулёза собранные на чистотах, обеззараживали и тестировали на наличие белковых биомаркеров – секретрируемых антигенов микобактерии, PstS-1 и ESAT-6. В образцах, полученных при 10-минутном дыхании у 32 больных и у 12 здоровых добровольцев иммуноглобулин А, специфичный к ESAT-6 или к PstS-1, был обнаружен у 24 больных и у 5 здоровых добровольцев. Таким образом, чувствительность и специфичность диагностики по выдыхаемому воздуху оценивается величинами 75%, и 58%, соответственно.

Разработанные в рамках данного исследования методы открывают новые возможности для ранней диагностики ТБ и других заболеваний легких и могут внести существенный вклад в обеспечение биобезопасности страны. Например, разработанные чистоты можно применить для анализа аэрозольных патогенов на транспорте, в публичных зданиях и на производстве. По результатам данного исследования опубликованы за 3 года 8 статей в международных журналах и еще 2 посланы в редакцию.

Список литературы

1. A.Y.Mikheev, Y.M.Shlyapnikov, I.L.Kanev, A.V.Avseenko, V.N.Morozov (2016) Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6. Eur. Pol. J. 75, 317–328.
2. Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. (2017) Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels. Anal. Chim. Acta, 966, 47-53.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ КАК ОСНОВНОЙ ЭЛЕМЕНТ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ РЕГИСТРАЦИИ.

Тихоненко С.А.¹, Дубровский А.В.¹, Мусин Е.В.¹, Ким А.Л.¹, Решетиллов А.Н.², Плеханова Ю.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия.

e-mail: tikhonenkosa@gmail.com

Одним из распространённых методов, используемых в клинической диагностике в настоящее время, являются клиничко-биохимические методы анализа определения состава биологических жидкостей. В настоящий момент широко используются энзимологические методы, отличительной особенностью которых является использование свободных ферментов. Однако, наряду с явными преимуществами такого подхода, есть и ряд недостатков: неоднозначность анализа в присутствии агрессивных к ферменту высокомолекулярных соединений, сравнительно небольшое время хранения, однократное использование фермента и т.д. Одним из способов устранения данных недостатков являются методы по иммобилизации ферментов, одним из которых является инкапсулирование фермента-сенсора в полиэлектролитные микрокапсулы. Нанесение таких микрокапсул на поверхность полевого транзистора позволит создать сенсорную систему с потенциометрической системой регистрации.

В работе предложен биосенсор на основе рН чувствительного полевого транзистора для детектирования мочевины. В качестве биорецептора использовали полиэлектролитные микрокапсулы (размер 3–4 мкм) со встроенными парамагнитными частицами Fe_3O_4 и ферментом уреазой, способным к биотрансформации мочевины. Микрокапсулы осаждали на затворной поверхности рН чувствительного ПТ при помощи постоянного магнитного поля. Данный способ формирования биосенсора занимает несколько секунд и не требует дополнительных химических реагентов для обработки поверхности электрода до и после измерения. Нижний предел детектирования мочевины составляет 0.03 мМ в диапазоне 0.03–100 мМ. Биосенсор имеет высокую чувствительность (~3.58 рН/мМ) и время формирования сигнала порядка 30–150 с в зависимости от концентрации мочевины.

В дальнейшем нами была проведена работа по изучению возможности капсулирования АДГ, с целью создания сенсора на этанол. Для этих целей методами флуоресцентной и оптической спектроскопии исследовано взаимодействие алкогольдегидрогеназы (АДГ) с отрицательно заряженными полистиролсульфонатом (ПСС) и декстрансульфатом (ДС) и положительно заряженным полидиаллилдиметиламмонием (ПДАДМА). Установлено, что ДС и ПДАДМА не влияли на структурные и каталитические свойства фермента, ПСС за 1 ч инкубации незначительно снижал величину собственной флуоресценции белка, что связано с частичным разрушением его четвертичной структуры (глобулярности). Изучение активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС показало, что она зависела как от времени инкубации, так и от влияния ПСС. Добавление в реакционную смесь хлорида натрия (2.0, 0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М) не уменьшало разрушающего действия ПСС на четвертичную структуру белка. В тоже время присутствие сульфата аммония или 0.2 М хлорида натрия стабилизировало фермент и частично снимало негативное влияние ПСС.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА. РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ И КЛЕТОЧНОЙ «МИМИКРИИ»

Фадеев Р.С., Евстратова Я.В., Кобякова М.И., Акатов В.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: Fadeevrs@gmail.com

Одним из определяющим условий возникновения устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к индукции апоптоза являются условия микроокружения в костном мозге, а в частности адгезия клеток ОМЛ к внеклеточному матриксу (ВКМ) костного мозга, включающим в свой состав коллагены, ламинины, фибронектин и гликозаминогликаны. Ранее нами были получены клетки острого миелоидного лейкоза способные к адгезии к внеклеточному матриксу. Данные клетки коммитированы в моноцитарно-макрофагальном направлении и обладают повышенной лекарственной устойчивостью к индукторам внешнего и внутреннего пути апоптоза на фоне сохранения пролиферативной активности.

В работе проведен качественный и количественный анализ экспрессии рецепторов семейства фактора некроза опухоли (ФНО) – FasR, TNFR1, TNFR2, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4 у клеток ОМЛ способных к адгезии на ВКМ. Также проведено исследование экспрессии основных белков системы множественной лекарственной устойчивости таких как Mdr1, Mrp1 и BCRP. А также исследовалась роль интегринов $\alpha V\beta 3$ и $\alpha V\beta 5$ в реализации устойчивости клеток ОМЛ, способных к адгезии к ВКМ, к рецептор-зависимому апоптозу и апоптозу, индуцируемому повреждением ДНК.

Показано, что в формировании лекарственной устойчивости к индукции рецептор-зависимого апоптоза у клеток ОМЛ, способных к адгезии к ВКМ, может принимать участие изменение экспрессии рецепторов семейства ФНО, в частности изменение экспрессии TRAILR2. В тоже время формирование устойчивости данных клеток к апоптозу, индуцируемому повреждением ДНК, не связано с белками системы МЛУ. Также было показано, что интегрины $\alpha V\beta 3$ и $\alpha V\beta 5$, принимают непосредственное участие в формировании устойчивости к апоптозу, индуцируемому повреждением ДНК, но не к рецептор-зависимому апоптозу.

Работа выполнена в рамках гранта Правительства РФ №14.Z50.31.0028.

ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ.

Шаталин Ю.В.¹, Шубина В.С.¹, Сантос Э.А.^{2,3}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²Отдел фармацевтической химии и технологии, Фармацевтический факультет Хельсинского университета, Хельсинки, Финляндия;

³Хельсинский институт науки о жизни (HiLIFE), Хельсинский университет, Хельсинки, Финляндия.

e-mail: it@rambler.ru

Изучение механизмов регенерации тканей и разработка материалов, способствующих их восстановлению, представляют собой актуальную задачу на сегодняшний день. В последнее время появляется все больше работ, направленных на разработку материалов, способных адресно доставлять лекарственные препараты. Целью данного исследования являлось создание методической основы для разработки материалов, способных высвобождать биологически-активные соединения в области повреждения, с перспективой их дальнейшего использования в качестве препаратов для регенеративной медицины. Одним из направлений исследования являлось получение гибридных материалов на основе гидроксиапатита, желатина, мезопористого силиката и проводящего полимера - полипиррола (PPy). Было установлено, что включение в состав материала PPy приводило к формированию каркасов с высокой пористостью и пролонгированным высвобождением модельных соединений по сравнению с контролем. Комплексное исследование свойств полученных материалов (doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.065) свидетельствует о том, что в дальнейшем они могут быть использованы для разработки новых остеозамещающих материалов. Другим направлением исследования являлось получение материалов на основе биodeградируемых полимеров и биологически-активных полифенолов. В ходе выполнения работы были получены гелевые материалы, скорость деградации которых зависела от концентрации введенного в их состав полифенола. Было показано, что как в модельных биохимических, так и в клеточных системах полученные материалы и входящие в их состав полифенолы проявляли высокую антиоксидантную активность. Аппликация материалов на поверхность ожога, индуцированного уксусной кислотой, приводила к увеличению скорости заживления раны по сравнению с контролем (аппликация коллагена) и уменьшению уровня малонового диальдегида в области повреждения. Таким образом, данные, полученные в ходе выполнения настоящего исследования могут служить основой для разработки новых комбинированных препаратов для регенеративной медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№14-44-03622 и №15-04-02377), CIMO Fellowship TM-14-9353.

:

ДЕФОРМАЦИЯ ТКАНЕЙ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ

Буданцев А.Ю.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: budantsev@mail.ru

Гистологический процессинг – комплекс технологий для подготовки препаратов для исследования структуры клеток и тканей в норме и при разных функциональных состояниях с использованием методов микроскопии. Первая технология в гистологическом процессинге – химическая фиксация (ХФ) ткани и клеток, цель которой: остановка биохимических процессов с сохранением микроморфологии (предотвращение постмортальных изменений). Для ХФ используются простые и составные фиксаторы с использованием альдегидов, спиртов, кетонов, органических и неорганических кислот и их солей и др. Все простые и сложные фиксаторы, достигая указанной цели, приводят к деформации формы и размеров клеток, внеклеточного матрикса и внутриклеточных органелл (сжатие или набухание тканей и клеток). Для оценки артефактов, связанных с объемной деформацией, предложен метод построения объемных моделей биологических образцов с использованием программы 3DStudio Max v.5.0. Объект – апикальная часть корня лука, представляющая структуру с вертикальной осью симметрии, что позволило использовать для построения 3-D моделей модификаторы Lathe и Loft с использованием инструментов редактирования сплайнов и модификаторов формы (Bend) . Разработанный метод был использован для оценки объемной деформации апексов корней при ХФ в разных фиксаторах (табл.1 и 2).

Табл.1. Коэффициенты относительного объемного сжатия ($v=\Delta V/V$) апексов в вводных и спиртсодержащих фиксаторах			
	Фиксаторы	$v=\Delta V/V$	
1	Формалин (Ф) (4% на фосфатном буфере рН=7,0))	-0,288	-0,399
2	Кларка (этанол (Э)+уксусная кислота (УК))	-0,204	-0,500
3	Карнуа (Э+хлороформ+УК)	-0,175	-0,425
4	Боуэна (пикриновая кислота+Ф+УК (данные не достоверны))	-	-

Табл.2. Хромсодержащие фиксаторы (объемы апексов, мм ³)			
	5. Навашин (ХК+Ф+УК)	6. Рего (БК+Ф)	7. Чиаччио (БК+Ф+УК)
Контроль	0,40±0,03 (10)*	0,37±0,02 (10)	0,33±0,01(9)
10 мин	0,34±0,03 (10)	0,32±0,01(10)	0,31±0,01(10)
3 ч	0,40±0,02 (10)	0,41±0,02 (10)	0,31±0,02(10)
6 ч	0,36±0,02 (10)	0,38±0,01 (10)	0,32±0,02(10)
10 ч	0,37±0,02 (10)	0,33±0,02 (10)	0,29±0,01(10)
24 ч	0,39±0,02 (10)	0,32±0,01 (10)	0,34±0,01(10)

Результаты данной работы необходимо учитывать при выборе фиксации тканей, что особенно важно при 3-х мерной аналитической реконструкции органов и тканей. Метод построения моделей, разработанный и примененный в данной работе, можно использовать на уровне микроанатомии (апексы), и для анализа изменения стереогеометрии тканей и клеток при ХФ. Подробно результаты изложены в [1-3]:1.Цитология, т.59,№5,362-368; 2.Цитология, т.59,№6,447-454;3.Цитология, т.59,№8,554-558.

**АВТОРЕГУЛЯЦИЯ И КРОССКОНТРОЛЬ В Ca^{2+} -
СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ СИГНАЛИЗАЦИИ С УЧАСТИЕМ
ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В АДИПОЦИТАХ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ
ТКАНИ И ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ЭТИХ СИСТЕМ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ДИАБЕТЕ
2 ТИПА.**

Дынник В.В. , Сирота Н.П., Гришина Е.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: dynnik@rambler.ru

Вторичные мессенджеры Ca^{2+} , IP3, NO, cGMP, PKG1, cAMP и PKA играют важную роль в регуляции липидного обмена адипоцитов белой жировой ткани (WAT), печени, поджелудочной железы, сердечно-сосудистой системы. «Адипозопатия» - дисфункция WAT рассматривается в качестве ключевого звена в патогенезе диабета, поскольку приводит к утрате важных эндокринных и иммунных функций, а также свойств буфера токсичных длинноцепочечных жирных кислот (LCFA). Регуляция липидного обмена WAT слабо изучена. Учитываются главным образом механизмы внешнего управления системой с участием норадреналина (через PKA), инсулина (PKB) и натрийуретического пептида (PKG). В настоящее время признается важная роль Ca^{2+} и NO в патогенезе ожирения и диабета 2 типа, однако механизмы их вовлечения в регуляцию липидного обмена и неконтролируемую гипертрофию и гибель адипоцитов при ожирении не исследованы.

Проведенные нами, совместно с коллегами из ИБК РАН, исследования показывают, что перечисленные выше мессенджеры и киназы включены в многопетлевые устойчивые генераторы (CaNORG) ритмических процессов в адипоцитах белой жировой ткани, интегрирующие и усиливающие входные сигналы гормонов и нейротрансмиттеров (Ach, NE, Ins, CCK, BK, Lept, Adn и т. Д.). Многоуровневая регуляция и надежность могут быть основаны на ковалентном контроле eNOS и PKB с помощью Ca^{2+} зависимых киназ, AMPK, PKG1, PKA. Гипертрофия культивируемых адипоцитов приводит к потере ритмичности и развитию общей гормональной сигнальной резистентности, связанной с резким подавлением экспрессии мРНК белков CaNORG, наблюдаемой даже в присутствии низких доз LCFA ($\leq 1\mu M$) в клеточных культурах. Сходное подавление наблюдается в условиях *in vivo* при ожирении в WAT, печени, поджелудочной железе и др., что может указывать на универсальные механизмы патогенеза. Обсуждаются возможные методы лечения, которые могут помочь восстановить дисрегуляцию CaNORG и дисфункцию соответствующих тканей. ГК № 16.512.11.2092. 2011-2013 гг. Грант РФФИ № 14-04-01695, 2014-2016 гг.

МЕТФОРМИН УВЕЛИЧИВАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ И УСИЛИВАЕТ ЭКСКРЕЦИЮ С МОЧОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК У КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Абдуллаев С.А.¹, Минкабирова Г.М.¹, Карманова Е.Е.^{1,2}, Газиев А.И.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия.

Метформин (МФ) используется во всем мире в терапии сахарного диабета 2-типа и находит применение при лучевой терапии опухолей. Известно также, что МФ блокирует индукцию канцерогенеза у животных, снижает частоту возникновения онкогенеза у пациентов, принимающих этот препарат, а также увеличивает продолжительность жизни у грызунов. Механизмы действия МФ остаются непонятными.

Ранее мы продемонстрировали, что у 24-месячных крыс наблюдается повышенная экскреция с мочой внеклеточной ядерной ДНК (вк-ядДНК) и митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) при введении им МФ, по сравнению с таковым у молодых крыс. Эти результаты позволили предполагать, что МФ способствует выводу из тканей клеток и органелл со структурными и функциональными нарушениями.

В настоящей работе мы исследовали влияние МФ на выживаемость облученных мышей и на образование микроядер в клетках их костного мозга, а также на уровень экскреции вк-ядДНК и вк-мтДНК с мочой у облученных крыс, который отражает активацию клеточной гибели в тканях животных. Результаты исследований показали, что МФ не оказывает радиозащитного эффекта при его введении перед облучением животных. Однако, МФ способствует повышению выживаемости мышей только при введении им после облучения. Так, на 11-е сутки после облучения мы наблюдали 100% летальность в контрольной группе, а при введении МФ 78% мышей оставались живыми. 20% мышей этой группы выжили в течение 30 дней после облучения 8 Гр. Аналогично действует МФ на образование микроядер, их существенное снижение регистрируется только при введении МФ после облучения животных. Эти результаты указывают, что МФ действует как пострадиационный митигаторный эффектор. Введение МФ необлученным крысам через 6 часов приводит к увеличению содержания вк-ядДНК и вк-мтДНК в моче на 25% и 55% соответственно. При введении МФ животным сразу после их облучения экскреция вк-ядДНК в моче через 6 и 12 часов повышается на 290-300%, а вк-мтДНК на 430-530%, относительно данных необлученных крыс. К этим же срокам, после облучения крыс без введения МФ в моче, происходит менее выраженное увеличение вк-ядДНК 180-200% и вк-мтДНК на 350-400% соответственно. При введении МФ крысам через 24 часа после их облучения, экскреция вк-ядДНК и вк-мтДНК с мочой этих крыс существенно снижается, хотя их уровни остаются выше, относительно данных необлученных животных, которым вводили МФ. Результаты анализов указывают, что радиомитигаторный эффект МФ на облученных животных, возможно, проявляется посредством митохондриально-направленного механизма. Данные по анализу экскреции вк-ядДНК и вк-мтДНК с мочой облученных животных позволяют предполагать, что МФ также способствует ускоренному удалению поврежденных клеток и дисфункциональных митохондрий из тканей облученных животных посредством активации аутофагии (митофагии). Возможно, МФ действует в тканях как “уборщик” поврежденных клеток, не давая им накопиться и трансформироваться в злокачественные клетки и, тем самым, обеспечивая им повышение выживаемости и снижение канцерогенеза после радиационного воздействия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00832.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА МЫШАХ, ОБЛУЧЕННЫХ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ IN VIVO

Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М., Сорокина С.С., Романченко С.П., Смирнова Е.Н., Закржевская Д.Т.
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: dyukina@rambler.ru

Цель настоящей работы - исследовать защитные свойства различных физических и химических агентов на мышах, облученных быстрыми ионами углерода и рентгеновским излучениями. В качестве физических агентов использовали голод, малые дозы ионизирующего (рентгеновские лучи (0.1 Гр, 0.5 Гр), ускоренные ионы углерода с энергией 450 МэВ/нуклон, (0.1 Гр, г. Протвино)) и неионизирующего излучений (диодная инфракрасная матрица (850 нм, 22 мВт/см², 10 мин), He-Ne лазер (632.8 нм, 0.7 мВт, 0.16 мВт/см², 15 и 100 с)) и химических – иммуномодулятор CaCl₂ (1г/250 мл воды в течении 6 суток) и противовоспалительный препарат ибупрофен (в/б 10 мг/кг однократно). Были поставлены следующие задачи: оценка количества цитогенетических повреждений с помощью микроядерного теста, относительной массы лимфоидных органов (тимуса и селезенки) и уровня продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции с помощью 12-канального прибора CHEMILUM-12 (Россия). Белых мышей линии SHK облучали по разработанной ранее схеме адаптивного ответа: облучение в дозах 0.1 Гр и через 24 ч 1.5 Гр. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей.

Анализ данных по количеству цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костного мозга показал, что предобработка животных всеми изученными агентами приводила к снижению радиочувствительности при последующем облучении рентгеновскими лучами или ускоренными ионами углерода в дозе 1.5 Гр по сравнению с непредобработанными животными. Предварительное облучение животных рентгеновским излучением в более высоких дозах 0.5 Гр или He-Ne лазером в течение 100 с не приводило к снижению количества цитогенетических повреждений. Аналогичные результаты наблюдаются при анализе клеточности лимфоидных органов. Определение уровня продукции АФК показало, что индекс активации, рассчитанный по отношению индуцированной светоплощади к спонтанной, был достоверно выше у всех предобработанных групп мышей, что говорит об активации естественной защиты по сравнению с группой животных, облученных только в дозе 1.5 Гр. В то же время предварительное облучение животных рентгеновским излучением в дозе 0.5 Гр или He-Ne лазером в течение 100 с не увеличивало индекс активации, по сравнению с непредобработанными животными, т.е. защитный эффект выявляется в одинаковом узком диапазоне доз и коррелирует с образованием АФК.

Таким образом, полученные результаты по исследованию защитных свойств различных агентов на мышах, облученных быстрыми ионами углерода и рентгеновским излучениями, зависят от величины и качества дозы активирующего воздействия, выбранных тканей и методов и демонстрируют сложную взаимосвязь между первичными сигналами, индуцированными различными агентами, и клеточными реакциями в кровяных и лимфоидных органах мышей, что требует дальнейших исследований.

Количество ПХЭ с микроядрами в клетках костного мозга животных, облученных инфракрасным, He-Ne лазерным, рентгеновским излучениями в дозе 0.1 Гр и ускоренными ионами углерода мышей при облучении их в дозе 1.5 Гр

Варианты облучения	Число мышей	Число анализ. ПХЭ	Число ПХЭ с микроядрами	ПХЭ с микроядрами, %
0.1 Гр X + 1.5 Гр ¹² C	5	10000	1384	6.9±0.72
0.1 Гр ¹² C + 1.5 Гр ¹² C	5	20000	1136	5.7±0.36
He-Ne 15'' + 1.5 ¹² C	5	20000	1213	6.1±0.27
ИКС 10' + 1.5 ¹² C	5	20000	1140	5.7±0.42
Голод (сут) + 1.5 ¹² C	4	16000	899	5.6±0.35
CaCl ₂ (6 дней с водой) + 1.5 ¹² C	5	20000	1359	6.8±0.46
Ибупрофен (10 мг/кг) + 1.5 ¹² C	5	20000	1297	6.5±0.35
1.5 Гр ¹² C	5	20000	1947	9.7±0.65
0.1 Гр ¹² C + 1.5 Гр X	5	15000	896	5.9±0.41
0.1 Гр X + 1.5 Гр X	5	20000	837	4.19±0.72
He-Ne 15'' + 1.5 X	5	20000	1213	6.10±0.45
ИКС 10' + 1.5 X	5	20000	1140	5.70±0.5
Голод (сут) + 1.5 X	5	20000	899	4.50±0.37
Ибупрофен (10 мг/кг) + 1.5 Гр X	5	20000	1245	6.2±0.32
CaCl ₂ (6 дней с водой) + 1.5 Гр X	5	15000	1052	7.0±0.47
1.5 Гр X	5	15000	1261	8.4±0.55
0.5 Гр X + 1.5 Гр X	5	10000	803	8.0±0.42
He-Ne 100'' + 1.5 X	5	10000	722	7.2±0.28

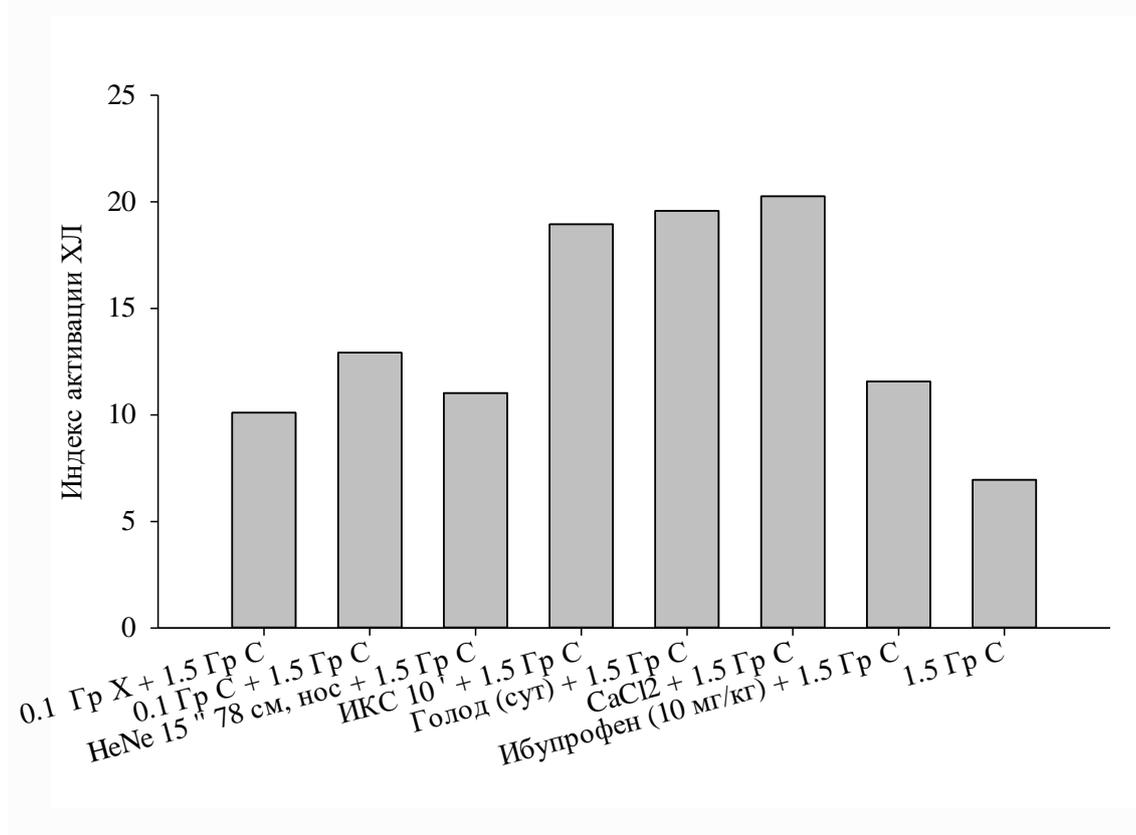
CaCl₂ - 1г/250 мл воды в течении 6 суток

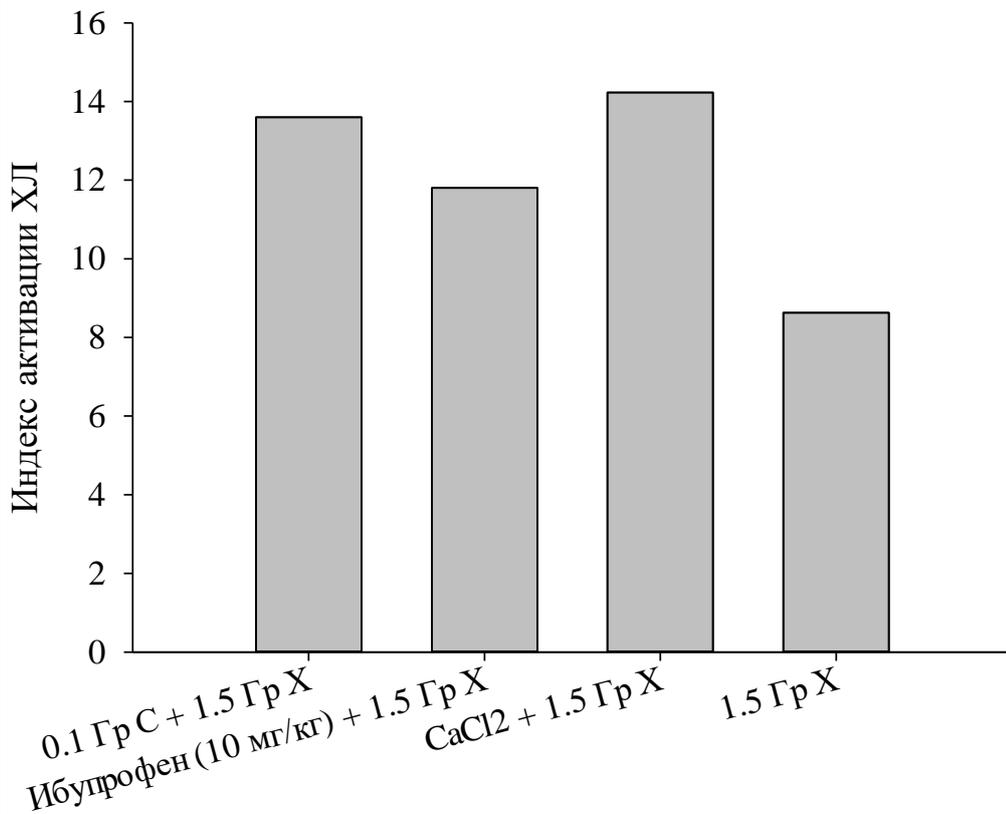
ибупрофен – в/б 10 мг/кг однократно

всем группам давали облучение ¹²C или X через 6 суток после адаптирующего воздействия

Варианты облучения	тимус	селезенка
0.1 Гр X + 1.5 Гр ¹² C	1,024±0,13	3,28±0,56
0.1 Гр ¹² C + 1.5 Гр ¹² C	0,87±0,05	2,87±0,83
He-Ne 15'' + 1.5 ¹² C	0,77±0,09	3,73±1,06
ИКС 10' + 1.5 ¹² C	0,74±0,08	3,70±0,62
Голод (сут) + 1.5 ¹² C	0,70±0,12	3,08±1,03
CaCl ₂ (6 дней с водой) + 1.5 ¹² C	0,83±0,07	2,52±0,47
Ибупрофен (10 мг/кг) + 1.5 ¹² C	0,83±0,03	3,16±0,73
1.5 Гр ¹² C	0,61±0,05	3,26±0,33
0.1 Гр ¹² C + 1.5 Гр X	1,06±0,12	4,48±0,69

0.1 Гр X + 1.5 Гр X	1.28±0,05	3.5±0,34
He-Ne 15'' + 1.5 X	1.21±0,12	3.71±0,38
ИКС 10' + 1.5 X	1.4±0,21	4.2±0,47
Голод (сут) + 1.5 X		
Ибупрофен (10 мг/кг) + 1.5 Гр X	0,84±0,10	6,67±1,81
CaCl ₂ (6 дней с водой) + 1.5 Гр X	0,75±0,06	4,19±1,09
1.5 Гр X	0,82±0,13	2,83±0,41
контроль	0,66±0,20	7,33±2,34
0.5 Гр X + 1.5 Гр X		
He-Ne 100'' + 1.5 X	1.01±0,21	3.65±0,73





1.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ПУЧКА УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА

Кузнецова Е.А., Сирота Н.П., Митрошина И.Ю., Смирнова Е.Н., Романченко С.П., Дюкина А.Р., Заичкина С.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: kuzglu@rambler.ru

Исследования воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на живые организмы остаются актуальными, поскольку сохраняется потенциальная возможность их облучения, как при радиационных авариях, так и с использованием радиоактивных материалов и источников излучений в промышленных целях, в медицине, а также воздействию ИИ подвергается персонал при высотных полетах. В частности, при радиотерапии используется воздействие не только редкоионизирующими, но и излучениями с высокой ЛПЭ; летчики и космонавты также подвергаются воздействию как редко-, так и плотноионизирующего излучения. В этой работе изучали изменение уровня повреждений ДНК в клетках периферической крови мышей, подвергнутых воздействию пучка ускоренных ионов углерода *in vivo*. Мышей-самцов линии SHK облучали в помещении временного радиобиологического стенда ускорительного комплекса У-70 (г. Протвино) пучком ионов углерода с энергией 450 Мэв/нуклон в режиме медленного вывода 1 раз в 8 сек, длительность выпуска – 0,6 сек или на рентгеновской установке РУТ-250-15-1 при мощности дозы 1,12 Гр/мин, напряжении 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см (г. Пущино). Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах периферической крови облученных мышей определяли методом «комета тест», позволяющим выявить широкий спектр повреждений ДНК в индивидуальных ядродержащих клетках, по параметру %TDNA – процент ДНК в хвосте «кометы». Кровь у мышей отбирали в разные сроки после облучения при надрезании кончика хвоста. У облученных ускоренными ионами углерода мышей через сутки после облучения обнаружено возрастание уровня повреждений ДНК с ростом доз до 2 Гр, а при 6 Гр наблюдалось его снижение по сравнению с 2 Гр. В отличие от этого, через сутки после воздействия на мышей рентгеновского излучения в дозах 1-5 Гр не обнаружено существенных изменений в уровнях повреждений ДНК, достоверно отличающихся от контроля. В тоже время, как после воздействия ионов углерода в дозах 0,1-1,5 Гр в эти сроки, так и после воздействия рентгеновского излучения наблюдалось снижение количества лейкоцитов в пробах крови. Зарегистрировано изменение %TDNA лейкоцитов в разные сроки после облучения мышей ускоренными ионами углерода: через 3 суток наблюдался рост уровня повреждений ДНК, через 21-24 сут. - его снижение по сравнению с 3-мя сут., а через 28-30 сут. снова наблюдалось повышение уровня повреждений ДНК, которое снижалось лишь к 75 суткам, но не достигало контрольного уровня. Характер изменения уровня поврежденности ДНК в сроки до 30 суток похож на таковой у мышей после воздействия сублетальных доз рентгеновского излучения. По-видимому, аналогичные процессы могут происходить и при облучении мышей пучком ионов углерода, но восстановления уровня повреждений ДНК до контрольного значения не наблюдается даже через 75 суток. Наблюдаемый повышенный уровень повреждений ДНК лейкоцитов к 75 суткам пострадиационного периода отчасти может быть обусловлен возникновением в разных типах клеток кластерных повреждений ДНК, которые формируются при воздействии тяжелыми ионами и являются трудно- или нерепарируемыми, а также может быть связан с внутриклеточной генерацией митохондриями активных форм кислорода, продолжающейся после воздействия радиации, и с процессами элиминации и восстановления поврежденных митохондрий.

СООТНОШЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КРОВИ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА

Митрошина И.Ю., Кузнецова Е.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: strelkova.ira@gmail.com

Молекулярные маркеры широко используются для диагностики и мониторинга различных патологических состояний организма человека. Перспективными объектами среди широкого спектра различных молекул являются нуклеиновые кислоты, в частности внеклеточные ядерная и митохондриальная ДНК, обнаруживаемые в несвязанном с клетками состоянии в периферической крови. Количественная оценка содержания внеклеточной ДНК в различных биологических жидкостях организма (кровь, моча и проч.) легла в основу чувствительных тест-систем, позволяющих выявить реакцию организма на различные воздействия на цитогенетическом уровне. В ходе изучения было установлено, что в крови условно здоровых доноров также содержится определенный базовый уровень нуклеиновых кислот. Он обусловлен процессами поддержания гомеостаза организма и регулируется ферментативными системами.

В своей работе мы показали, что базовый уровень нуклеиновых кислот (совокупно ядерной и митохондриальной) зависит от пола и возраста доноров. Было установлено, что концентрация нуклеиновых кислот в сыворотке крови молодых доноров достоверно отличаются от таковой у пожилых доноров. Также нам удалось выявить достоверные различия в концентрации внеклеточной ДНК для группы молодых доноров разных полов и отсутствие различий между группами пожилых доноров. Вероятно, пожилой возраст нивелирует половые различия в процессах, вызывающих появление нуклеиновых кислот в крови.

Однако не только изменение концентрации внеклеточной ДНК периферической крови может быть информативным показателем происходящих в организме патологических процессов. При одинаковых концентрациях внеклеточной ДНК, обнаруживаемых у различных доноров или одного донора в процессе динамического наблюдения, соотношение вклада ядерной и митохондриальной ДНК в эти значения может быть различным.

Мы обнаружили, что соотношение ядерной и митохондриальной ДНК в группах условно здоровых мужчин и женщин молодого возраста достоверно отличается друг от друга. Интересным результатом является тот факт, что в группе молодых женщин число копий митохондриальной ДНК, обнаруживаемой в периферической крови, превышает значения для мужчин, тогда как количество копий ядерной ДНК понижено по сравнению с мужской группой. Объяснение этого факта требует дальнейших исследований.

В группе условно здоровых пожилых доноров разного пола различий по числу копий ядерной и митохондриальной ДНК выявлено не было.

Т.о. в случае использования параметра концентрации внеклеточной ДНК, а также соотношение числа копий ядерной и митохондриальной ДНК в периферической крови в качестве дополнительного средства в диагностике различных патологий нужно учитывать пол и возраст пациентов.

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА ИОНОВ УГЛЕРОДА НА ПОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В РАННИЕ И ПОЗДНИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ.

Сорокина С.С., Мальков А.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н.
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: sv0723@yandex.ru

В настоящее время перед научным сообществом стоит ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия плотноионизирующего излучения на организм. Одна из них связана с активным применением ускоренных ионов разных энергий для лечения онкологических заболеваний, при этом возникла проблема оценки влияния курсов радиотерапии на когнитивные функции больного, в связи с чем часто ухудшается качество жизни после лечения. Вторая задача связана с запланированными полётами на Луну и Марс, поскольку экипажи будут подвергаться длительному воздействию галактического излучения, в спектре которого преобладают протоны и ионы высоких энергий - углерода и железа. В последние годы широко признан потенциал ионизирующих излучений в индукции значительных когнитивных эффектов у взрослых и детей, подвергающихся лучевой терапии или оказывающихся в неблагоприятной техногенной обстановке, при этом большинство исследований сосредоточены на долгосрочных когнитивных нарушениях, связанных с функционированием гиппокампа (Rosi S. et al., 2012). Несмотря на то, что клеточные и молекулярные мишени этих процессов остаются неизвестными, предполагается, что плотноионизирующее излучение может влиять на функциональные свойства нейронов и тем самым приводить к дисбалансу в нейронной сетевой активности. Такой дисбаланс приводит к неврологическим изменениям, которые могут повлиять на интеллектуальные способности и поведенческие реакции, что критично, в частности, во время длительных космических полётов. На сегодняшний день недостаточно фундаментальных исследований биологического действия малых и средних доз ускоренных ионов углерода с различными физическими характеристиками *in vitro*, а работы на животных *in vivo* проводятся в единичных Лабораториях.

Целью нашей работы явилось исследование влияния терапевтического пучка ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 0.7 Гр на поведение лабораторных мышей в ранние и поздние сроки после облучения. Эксперименты проводили на 2х-месячных самцах мышей колонии SHK весом 28-32 г. Перед облучением животных помещали на платформу в специальных контейнерах. Облучение однородным пучком ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 0.7 Гр, сформированным «воблер» магнитом, осуществляли в помещении временного радиобиологического стенда ускорительного комплекса У-70 (ИФВЭ НИЦ "Курчатовский институт" г. Протвино). Через 2 суток или через 2 месяца после облучения для оценки общей активности, пространственного обучения, долговременной и кратковременной гиппокамп-зависимой памяти мышей использовали следующий набор методик: «открытое поле», лабиринт Барнса и распознавание нового объекта. В результате проведённых экспериментов обнаружено, что мыши, облученные терапевтическим пучком ионов углерода, проявляют разную измененную модель поведения в зависимости от сроков тестирования после облучения. Негативные эффекты влияния облучения на гиппокамп наиболее выражены на более позднем сроке после облучения, что подтверждается данными гистологического исследования мозга облученных животных. Полученные результаты свидетельствуют о наличии как ранних, так и отсроченных повреждений гиппокампа после облучения, при этом последние могут быть необратимыми, с прогрессирующим патогенезом, что требует дальнейших исследований.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА ИОНОВ УГЛЕРОДА ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ

Шемяков А.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Романченко С.П.,
Сорокина С.С., Дюкина А.Р., Поцелуева М.М.
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: alshemyakov@yandex.ru

В мире непрерывно разрабатываются новые методы для борьбы с онкологическими заболеваниями. Одним из таких методов является лучевая терапия пучками ионов углерода, которые могут лечить труднодоступные, а также радиорезистентные новообразования. Целью работы являются следующие задачи: отработка способов позиционирования животных в зоне облучения, получение дозовых зависимостей количества цитогенетических повреждений в костном мозге, определение клеточности лимфоидных органов (тимуса и селезенки), формулы крови и уровня продукции АФК в цельной крови при облучении мышей ускоренными ионами углерода с энергией 450 МэВ/нуклон до, после и в пике Брэгга и рентгеновским излучением в диапазоне доз от 0.1 до 1.5 Гр.

Исследования проводили на двухмесячных самцах мышей линии SHK *in vivo* в помещении временного радиобиологического стенда ускорительного комплекса У-70 (г. Протвино). Облучение пучком ионов углерода проходило в режиме медленного вывода 1 раз в 8 сек, длительность выпуска – 0,6 сек при сопровождении каждой экспозиции дозиметрической пленкой «ЕВТ 3» (Gafchromic® film), а рентгеновскими лучами - на установке РУТ при напряжении 200 кВ и средней мощности дозы 1 Гр/мин. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 6 мышей. Животных выводили из эксперимента методом декапитации через 28 ч после воздействия. Критерием цитогенетических повреждений служил процент полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге. Относительные массы тимуса и селезенки были рассчитаны по отношению среднего абсолютного веса органа к среднему весу животного в группе. Формулу крови определяли с помощью гемоанализатора АСТ8. Уровень продукции АФК в цельной крови измеряли методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции с помощью 12-канального прибора СНЕМILUM-12 (Россия). Ответ хемилюминесценции в крови определяется, в основном, реакцией фагоцитирующих клеток, продуцирующих АФК. Для оценки статистической достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента.

В результате проведенных экспериментов были получены следующие результаты: 1) в диапазоне доз от 0.1 до 1.5 Гр нелинейная дозовая зависимость выхода полихроматофильных эритроцитов с микроядрами и значение относительной биологической эффективности 1.3 - 2.4; 2) относительные массы тимуса и селезенки значительно ниже при более низких дозах по сравнению с мышами, облученными рентгеновским излучением; 3) формула крови практически совпала при обоих видах облучения; 4) индекс активации хемилюминесценции снижался с увеличением дозы облучения, что свидетельствует об истощении резерва защитных систем организма.

Таким образом, полученные данные указывают на более высокую эффективность радиотерапии ионами углерода по сравнению с рентгеновским излучением и могут послужить основой для разработки рекомендаций нормирования радиационных нагрузок при длительных космических полетах.

ISBN 978-5-91874-022-4

