

На правах рукописи

МЕДВЕДЕВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

ПОЛИСИСТЕМНАЯ ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИ  
ОБУСЛОВЛЕННОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
ОРГАНИЗМА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

**Научные руководители:**

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Алчинова Ирина Борисовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

**Официальные оппоненты:**

Архипенко Юрий Владимирович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории адаптационной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины.

Иванов Александр Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией радиационной иммунологии и экспериментальной терапии радиационных поражений Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» МЗ РФ.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.003.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (адрес сайта [www.niiopp.ru](http://www.niiopp.ru))

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

Л.Н. Скуратовская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время организм человека повсеместно сталкивается с источниками ионизирующего излучения: стремительное развитие атомной промышленности, вероятность возникновения техногенных катастроф на ядерных объектах, использование медицинского облучения в диагностических и терапевтических целях – все это увеличивает контингент людей, контактирующих с источниками ионизирующего излучения [Ярмоненко С.П., 2004; Homeland Security Council, 2005, 2009]. В условиях постоянно повышенного радиационного фона работают и космонавты. В течение космического полета организм подвергается комбинированному воздействию излучения, микрогравитации и других факторов. В связи с этим анализ их влияния на организм и оценка адаптационных возможностей являются одними из первостепенных задач медико-биологических исследований [Федоров В.П., 1990; Шафиркин А.В. и др., 2007]. Изучение биологических механизмов, способных оказывать воздействие на здоровье людей при низких мощностях доз, было признано одним из пяти перспективных направлений исследований в Докладе Научного комитета Организации Объединенных Наций по действию атомной радиации в 2016 г.

Сравнение физиологических параметров линейных животных, различающихся устойчивостью к повреждающим воздействиям, и анализ данных по их генетическому полиморфизму и экспрессии отдельных генов является перспективным подходом к решению этой задачи. Сопоставление генетических профилей с физиологическими реакциями на нагрузочные пробы в перспективе позволит осуществлять индивидуальный расчет рисков развития заболеваний и их профилактику.

Проблема оценки адаптационных реакций в ответ на действие ионизирующего излучения (ИИ) состоит в генотипическом разнообразии высших многоклеточных организмов, в сложности протекающих реакций в ответ на облучение [Гончарова И.А. и др., 2003], многообразии внешних факторов, модулирующих этот ответ. Для исследования индивидуальной радиочувствительности необходимо применять полисистемный подход, который позволяет оценить суммарный результат патологического процесса и работы приспособительных механизмов, на разных уровнях организации.

**Цель диссертационной работы.** Оценить радиационно-индуцированные изменения на различных уровнях организма в зависимости от генетически детерминированной радиочувствительности и апробировать разработанные методические подходы в космическом эксперименте на молекулярно-клеточном уровне.

**Задачи диссертационной работы:**

1. В опытах на трех линиях мышей, отличающихся по радиочувствительности, апробировать систему тестов, позволяющую комплексно оценивать последствия облучения на разных уровнях организма.

2. Определить информативные методы исследования для использования в условиях космического эксперимента.

3. В ходе наземных экспериментов при подготовке к полету спутника «БИОН-М» №1 выявить эффекты микрогравитации и облучения с помощью предложенных методов.

4. В ходе космического эксперимента «Резистентность» определить изменения, возникающие в организме животного на молекулярно-клеточном уровне, после полета и при ре-адаптации.

5. Оценить апоптотические изменения в клетках костного мозга мышей при радиоадаптивном ответе в послеполетный период по сравнению с наземными контрольными группами.

**Научная новизна.** Впервые были сопоставлены генетические профили мышей (по данным базы Mouse Phenome Database и данным литературы) трех линий с их фенотипическими реакциями в ответ на облучение в сублетальной дозе 7,5 Гр на молекулярно-клеточном, органом и организменном структурно-функциональных уровнях с применением интегрального метода исследования лазерной корреляционной спектроскопии. В работе была проведена полисистемная оценка радиочувствительности мышей трех линий, для которых характерна различная генетически детерминированная радиочувствительность. Комплексное применение интегральных методов расширяет понимание индивидуальной радиочувствительности организма и позволяет проследить отличия в реакциях в ответ на острое облучение и оценить тяжесть течения возникшего патологического процесса.

В работе впервые были показаны изменения, происходящие в субфракционном составе плазмы крови мышей при действии факторов космического полета. В опытах на клетках костного мозга при радиационно-индуцированном адаптивном ответе показано, что

пребывание мышей в течение 30 суток на околоземной орбите приводит к изменению их адаптационной реактивности к действию радиации, что проявилось в снижении апоптотического индекса.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Одной из основных задач космической биологии и медицины является исследование влияния факторов космического полета на процессы жизнедеятельности с целью создания научной основы медицинского обеспечения полетов в околоземном пространстве и дальнем космосе с учетом генетического разнообразия человеческого организма. Многолетними экспериментами на биоспутниках доказано, что в орбитальных полетах разной продолжительности в сердечно-сосудистой, сенсомоторной и скелетно-мышечной системах происходят структурно-функциональные изменения, сравнительно быстро нормализующиеся в послеполетный период. Большинство исследователей эти сдвиги трактуются как адаптация к условиям космического полета. Полисистемная оценка адаптации организма и, в частности, выяснение молекулярно-клеточных механизмов этой адаптации представляет несомненный теоретический и практический интерес. Выявленные в ходе проведенных нами наземного и космического этапов работы сдвиги в плазменном гомеостазе и модификация радиочувствительности клеток костного мозга вносят вклад в понимание процессов, проходящих в организме в ходе космического полета, и могут стать основой для практических рекомендаций по профилактике их негативных последствий.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Радиочувствительность организма при облучении нелетальными дозами должна оцениваться в комплексе по изменениям на молекулярно-клеточном, органном и организменном уровнях.
2. Факторы космического полета модифицируют радиорезистентность клеток костного мозга в послеполетном периоде.

**Внедрение в практику.** Результаты и основные научно-методические положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина» по дисциплинам «Основы радиобиологии» и «Спецпрактикум» при подготовке бакалавров по направлению «Биология» (акт от 28 ноября 2016 г.).

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на студенческой конференции МВА им. К.И. Скрябина «Наука глазами студентов», Москва, Россия, 2011; 20th Euroconference «From

Death to Eternity», Rome, Italy, 2012; V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины», Ростов-на-Дону, Россия, 2013; Конференции молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология», Москва, Россия 2013; 40th Scientific Assembly “COSPAR”, Moscow, 2014; ICLAS International Conference “Science-based assessment of laboratory animal welfare”, Saint-Petersburg, Russia, 2014; XV Конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием «Проект Бион-М1: результаты и перспективы экспериментов и исследований», Москва, Россия, 2014; IV Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», Москва, Россия, 2015; 23rd conference of the European Cell Death Organization «Death pathways and beyond», Geneva, Switzerland, 2015; Discovery Science – 2016: международном интеллектуальном конкурсе студентов и аспирантов, Москва, 2016; VII Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем», Звенигород, Россия, 2016.

**Публикации и личный вклад автора.** По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах (из них 3 из перечня ВАК) и 9 тезисов в сборниках материалов научных конференций.

Личный вклад автора состоит в выработке научного плана исследований и выполнении экспериментальных работ, вошедших в совместные публикации. Все основные экспериментальные данные диссертационного исследования получены автором лично. Лазерную проточную цитометрию проводили совместно с с.н.с. Таллеровой А.В. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова». Гистологическое исследование проводили совместно с к.в.н., ассистентом Антиповым А.А. кафедры общей патологии им. В.М. Коропова ФГБОУ ВО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина».

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий работы на русском (172) и иностранном (98) языках. Диссертация

изложена на 133 страницах машинописного текста и содержит 14 таблиц и 31 рисунок.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Экспериментальное исследование разделили на три этапа: ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ, НАЗЕМНЫЙ и КОСМИЧЕСКИЙ. Всего в исследовании использовано 255 лабораторных мышей.

На ПОДГОТОВИТЕЛЬНОМ этапе использовали три линии мышей, отличающихся устойчивостью к ИИ – СЗН/SnY (далее СЗН), 101/НУ (далее 101) и С57BL/6JY (далее С57BL/6), полученных из коллекционного фонда Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Всего было исследовано 120 мышей-самцов, массой 22-27 г. На данном этапе применяли комплексный подход для оценки биологических эффектов ИИ на разных структурно-функциональных уровнях.

Однократное тотальное облучение экспериментальных групп мышей проводили на цезиевом облучателе «Панорама» до общей дозы 7,5 Гр в течение 2,5 часов на базе ФГБУ ВПО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина». Через 3 и 6 недель осуществляли эвтаназию животных путем декапитации.

Молекулярно-клеточный уровень. На молекулярном уровне оценивали субфракционные изменения в сыворотке крови мышей методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) (Сертификат RU.C. 39.003.A № 5381). Данный метод предназначен для измерения спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения в результате светорассеяния гелий-неонового лазера при прохождении через полидисперсную систему [Лебедев А.Л., 1987]. Измерения проб сыворотки крови проводили при частоте 16384 кГц в количестве 2000 накоплений, регуляризацию спектра – с использованием программы Viewer, входящей в программное обеспечение спектрометра. Результат обработки представляет собой кривую. Сравнение ее площади позволяет определить изменение процентного вклада в светорассеяние частиц разного размера. В полученных распределениях были выделены информативные зоны спектра с помощью программного обеспечения Matlab: к I зоне относятся мелкие частицы с радиусом в диапазоне 0 – 20,6 нм, ко II – 20,6 – 67,8 нм, к III – более 67,8 нм.

Для определения количества лейкоцитов периферической крови подсчитывали лейкоцитарную формулу (200 клеток на мазок), ко-

торуЮ проводили при иммерсионной микроскопии окрашенных по Паппенгейму мазков. Рассчитывали индекс сдвига лейкоцитарной крови (ИСЛК) как отношение суммы относительного содержания эозинофилов, базофилов и нейтрофилов к сумме относительного содержания моноцитов и лимфоцитов. Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов и общего содержания лейкоцитов крови мышей использовали метод трехцветного цитометрического анализа на проточном лазерном цитометре EPICS XL 4 color (Beckman Coulter, США). Окрашивание клеточной суспензии проводили по протоколу фирмы-производителя антител BendlMedSystems [Таллерова А.А. и др., 2012]. Учет результатов цитометрии осуществляли на основании анализа 5000 - 10000 событий.

Органный уровень. В конце эксперимента все лабораторные животные были подвергнуты эвтаназии путем декапитации с дальнейшим взятием органов (печень, поджелудочная железа, селезенка) для проведения гистологического исследования. Препараты готовили согласно принятой методике [Лилли Р., 1969; Меркулов Г. А., 1969]. Для мышей линии C57BL/6 взяли дополнительную временную точку - через 3 недели после облучения. В зависимости от изменения морфологии клеток и тканей органов были выделены различные степени тяжести повреждения.

Организменный уровень. За час до взвешивания лабораторных животных лишали корма. Для изучения изменения поведения мышей использовали установку «Открытое поле» Opto-Varimex («Columbus instruments», США). Тестирование проводили в камере с прозрачными стенками размером 45x45 см, при освещении в 40 Люкс в течение 3 мин [Самотруева М.А. и др., 2009]. Оценивали горизонтальную и вертикальную двигательную активность, время в покое, стереотипные и мелкие движения.

НАЗЕМНЫЙ этап эксперимента был проведен на 83 мышамсамцах линии C57BL/6, полученных из коллекционного фонда Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России, для моделирования основных факторов космического полета (микрогравитация и действие ИИ), из них: контрольная группа (n=40), группа, облученная малыми дозами (n=23), группа с антиортостатическим вывешиванием (АОВ) (n=20).

Моделирование эффектов микрогравитации. Для моделирования эффектов микрогравитации применяли антиортостатическую силовую разгрузку мышц за счет вывешивания мышей за основание



хвоста [Chowdhury P. et al., 2013]. Мышей фиксировали за основание хвоста под углом  $30^{\circ}$  к горизонтали в специальном стенде. Длительность АОВ составила 2 и 4 недели.

Моделирование эффектов малых доз радиации. Моделирование хронического воздействия космического излучения проводили реализуемыми в наших условиях методами: группу мышей подвергали однократному тотальному гамма-облучению в дозе 0,05 Гр. Данная доза эквивалентна дозе, которую мыши получили в рамках проекта «БИОН-М» №1 [Иноземцев К.О. и др., 2015].

Метод ЛКС. Для сравнения изменений субфракционного состава плазмы крови мышей после моделирования микрогравитации и действия ИИ с полученными в дальнейшем данными по космическому эксперименту, использовали метод ЛКС.

КОСМИЧЕСКИЙ этап работы проходил в рамках космического проекта «БИОН-М» №1. Входящий в него космический эксперимент «Резистентность», проводимый ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», выполнен на мышах-самцах линии C57BL/6N, возраст 4-5 месяцев, масса 22-32 г, полученных из питомника «Пушино» [Андреев-Андриевский А.А. и др., 2014]. Космический аппарат «БИОН-М» № 1 находился на околокруговой орбите (средняя высота 575 км, наклонение  $64,9^{\circ}$ ) в течение 30 суток [Сычев В.Н. и др., 2014]. За весь полет интегральная поглощенная доза составила около 0,05 Гр [Иноземцев К.О. и др., 2015]. Для выполнения эксперимента «Резистентность» наша лаборатория получила плазму крови, плечевые и тазовые кости мышей. Всего было исследовано 53 мыши. Животные были разделены на 8 групп, одна из которых – полетная, остальные – контроли разных видов.

Метод ЛКС. Забор цельной крови для оценки сдвигов в плазменном гомеостазе крови мышей осуществляли сразу после эвтанизации животных через 12 часов после посадки биоспутника.

Выделение клеток костного мозга (ККМ). ККМ стерильно с помощью шприца выделяли из диафизов плечевых и тазовых костей средой RPMI-1640 (T) с аланил-глутамином («ПанЭко», Россия) в центрифужные пробирки с последующим дезинтегрированием (Lapfuge-vortex). Концентрацию клеток доводили до  $1 \cdot 10^6$ /мл полной среды. Для культивирования клеток использовали ту же среду с добавлением антибиотиков (1 мл на 50 мл среды) и эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США) в количестве 10% от объема среды на флакон.

Схема исследования индуцированного радиоадаптивного ответа (РАО). Для исследования чувствительности к облучению была поставлена схема индукции радиоадаптивного ответа на ККМ [Antoscina M.M. et al., 1997; Mortazavi S.M.J. et al., 2006]. Флаконы с ККМ облучали на цезиевом облучателе «Панорама» в разных дозах: группу АД – в адаптирующей дозе (0,05 Гр) на стадии G0 митотического цикла, группу ПД – в повреждающей дозе 0,5 Гр, группу АД+ПД подвергали облучению 2 раза – сначала в адаптирующей дозе, а потом в повреждающей на стадии G2 митотического цикла. Контрольную группу не подвергали облучению. Облучение в АД происходило в день выделения ККМ из костных тканей. Далее добавляли фитогемагглютинин-П («ПанЭко», Россия) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Через 48 часов происходило облучение ПД. Флаконы с клетками инкубировали в термостате при 37°C от посева до фиксации. За два часа до фиксации был внесен 0,04% колхицин («ПанЭко», Россия). Фиксацию клеток проводили через 52 часа после последнего облучения: содержимое флаконов центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин и удаляли супернатант. К осадку добавляли 10 мл гипотонического раствора KCl (37°C), инкубировали 15 мин при 37°C и повторяли процедуры. Осадок перемешивали на вортексе и добавляли по каплям фиксатор (смесь ледяной уксусной кислоты и этанола 1:3) до общего объема 10 мл. Фиксатор в пробирках с клетками меняли дважды.

Оценка уровня апоптоза. Определяли апоптотический индекс (АИ) ККМ с помощью набора DeadEndFluorometric TUNEL System (G3250) («Promega», USA). TUNEL-метод основан на флуоресцентном мечении окончаний отрезков ДНК, образовавшихся в результате фрагментации [Шмаров Д.А. и др., 2013]. Препараты-мазки готовили путем раскапывания суспензии ККМ на влажные охлажденные предметные стекла (по 40 мкл) с расстояния около 20 см. Все манипуляции с мазками проводили в соответствии с протоколом производителя. Далее образцы окрашивали красителем Hoechst33342 (Sigma-Aldrich (Merck), Germany) и трехкратно отмывали фосфатным буфером. Апоптоз оценивали с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-U. Фотографии клеток были сделаны камерой Infinity 3 в программе Infinity Analyse. АИ определяли как отношение общего числа TUNEL-позитивных ядер к количеству клеток, окрашенных Hoechst33342 и имеющих видимое непикиотизированное ядро.

Биоэтическая экспертиза. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ и НАЗЕМНЫЙ этапы проводили с разрешения и под надзором Этического комитета ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» (протоколы №2 от 15.02.2013 и №3 от 05.12.2016). Биоэтическая экспертиза космического проекта «БИОН-М1» проводилась Комиссией по биоэтике НИИ митоинженерии МГУ (протокол №35 от 01.11.2012) и Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 319 от 04.04.2013).

Статистические методы. Анализ полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные методы вариационной статистики. Использовали непараметрические критерии Манн-Уитни (U), Вилкоксона (T) и Крускала-Уоллиса (H).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

1. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП. На данном этапе происходила разработка и апробация батареи тестов для комплексной оценки действия ИИ на организмы с генетически детерминированной радиочувствительностью. Одним из преимуществ комплексного подхода является возможность уделить внимание восстановлению нормальной жизнедеятельности организма в целом, учитывая его индивидуальную реактивность.

Использовали 3 линии мышей, отличающихся чувствительностью к действию радиации. По данным литературы мыши линии 101 характеризуются генетической радиочувствительностью, связанной с хромосомной нестабильностью [Малашенко А.М. и др., 2003; Бояршинова О.С. и др., 2009]. Мышей линий С3Н и С57ВL/6 считают радиорезистентными линиями [Mikhaililov V.F. et al., 2005; Takabatake T. et al., 2008].

В нашей работе генетические особенности мышей линий С3Н/Sn и С57ВL/6J выявлены с помощью баз данных International Mouse Genome Informatics, Mouse Phenome Database. В нормальных условиях у мышей линии С3Н/Sn повышена экспрессия 257 генов по сравнению с С57ВL/6J (207 генов). Были отобраны те гены, которые могли участвовать в модуляции реакций организма на гамма-излучение. Для генетического профиля мышей линии С3Н/Sn характерно большее количество высокоэкспрессируемых генов систем репарации ДНК и оксидативной защиты. Для мышей линии 101/Н характерно наличие рецессивной мутации гена mut-1, приво-

дящей к дефекту эксцизионной репарации, что повышает чувствительность к генотоксикантам [Магкоева Ф.З. и др., 2007; Бояршинова О.С. и др., 2009]. У мышей линии C57BL/6J большее число высокоэкспрессируемых генов-активаторов иммунного надзора по сравнению с мышами линии C3H/Sn. Различия в исходном уровне экспрессии генов у мышей обуславливают скорость развития ответа на генотоксический стресс на разных структурно-функциональных уровнях и определяют механизмы реализации компенсаторно-приспособительных реакций.

Молекулярный уровень. В результате проведенной интегральной оценки сывороточного гомеостаза мышей методом ЛКС и дальнейшей обработки результатов при помощи программного обеспечения Matlab были посчитаны площади под кривыми ЛК-спектров. Таблица 1 демонстрирует превалирование сдвигов сывороточного гомеостаза в сторону увеличения вклада в светорассеяние частиц высокомолекулярных фракций у облученных групп мышей. Доказано, что возрастание числа высокомолекулярных частиц в сыворотке крови свидетельствует об аутоиммунноподобных патологических сдвигах [Карганов М.Ю. и др., 2004], возникновении пострадиационных неонкологических заболеваний [Аклеев А.В. и др., 2005], служит индикатором появления свободной внеклеточной ДНК [Пирузян Л.А. и др., 2004; Алчинова И.Б. и др., 2012].

Таблица 1. Площади под кривыми ЛК-спектров опытных групп мышей

Линия мышей	Недели	Площадь под кривой относительно контроля		
		зона I	зона II	зона III
C3H/SnY	3 нед	-63,3	-23,13	66,32
	6 нед	-36,01	31,7	-14,54
101/HY	3 нед	-39,98	-21,14	78,52
	6 нед	-29,18	11,53	21,82
C57BL/6JY	3 нед	14,29	6,79	-13,11
	6 нед	-8,24	-2,77	14,17

Видно, что мыши линии C3H были более адаптированы к действию облучения по сравнению с мышами линии 101. У них к 6й неделе нормализовалось содержание частиц III зоны, но с сохранением увеличенного вклада частиц II зоны (с радиусом около 50-70 нм). Мыши линии 101 были менее адаптированы к действию облучения по сравнению с другими: накопление частиц высокомолеку-

лярных фракций (165-300 нм) сохранялось и к 6 неделе после облучения. Реакция мышей линии C57BL/6 существенно отличалась – через 3 недели наблюдали небольшое повышение низкомолекулярной фракции, к 6й неделе происходило накопление высокомолекулярных фракций (122-223) в небольшом проценте.

**Клеточный уровень.** В лейкоцитарной формуле были выявлены значимые изменения в содержании палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. После облучения у мышей линии 101 достоверного изменения в содержании клеток не зафиксировано. У мышей линий C57BL/6 и СЗН регистрировали увеличение выхода в кровь нейтрофилов и снижение лимфоцитов на начальных сроках облучения с тенденцией к восстановлению их численности. На основе лейкограммы был посчитан ИСЛК, характеризующий наличие воспалительной реакции и нарушение иммунологической реактивности организма. У мышей линий СЗН и C57BL/6 было зафиксировано достоверное повышение ИСЛК, у линии 101 выявлена тенденция к такому изменению (Рис. 1).

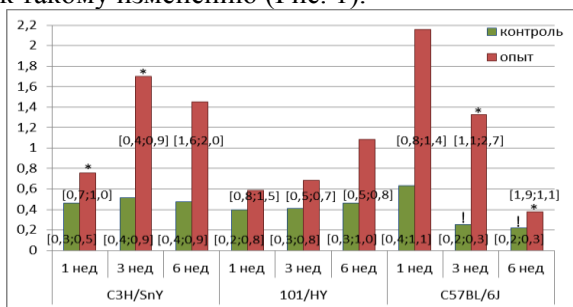


Рисунок 1. Индекс сдвига лейкоцитарной крови мышей линий C3H/SnY, 101/HY и C57BL/6JY. \* -  $P_U < 0,05$  с контрольной группой, ! -  $P_U < 0,05$  с линией мышей C3H/SnY. Верхняя и нижняя квартили указаны в квадратных скобках.

На основе анализа данных генетической базы было выявлено, что у мышей линии C57BL/6J по сравнению с линией C3H/Sn количество генов с повышенной экспрессией, ответственных за функциональную активность лимфоцитов, выше. При исследовании содержания лимфоцитов методом лазерной проточной цитометрии к 6й неделе выявили: у мышей линий C3H – истощение пула Т- и В-лимфоцитов, у линии 101 – уменьшение В-клеток, у линии C57BL/6 – восстановление кроветворной функции, возможно, за счет повышенной экспрессии генов пролиферации лимфоцитов.

Увеличение процента высокомолекулярных частиц в сыворотке крови, повышение ИСЛК, уменьшение содержания лимфоцитов свидетельствует о нарушении иммунологической реактивности организма после действия гамма-излучения, что повышает риск развития отдаленных последствий облучения [Mukherjee D., 2014].

Органный уровень. Гистологическое исследование ткани печени показало, что у облученных животных изменения представлены в различных степенях тяжести (всего 5). У мышей линии СЗН радиационное поражение печени представлено 2й степенью тяжести, для которой характерно развитие белковой и жировой дистрофии с очагами некроза. Для линии 101 характерно появление 3й (33 %) степени тяжести, отличительной особенностью которой является развитие тяжелой токсической дистрофии. Для мышей линии С57BL/6 характерны менее тяжелые повреждения по сравнению с двумя другими линиями.

Для мышей линии С57BL/6 были дополнительно исследованы ткани селезенки и поджелудочной железы. К 6 неделе эксперимента в ткани селезенки наблюдали уменьшение, а в ткани поджелудочной железы – небольшое увеличение процента более тяжелых степеней повреждения по сравнению с 3 неделей.

Организменный уровень. Изменение массы тела – один из параметров, объективно характеризующий состояние организма в целом. В наших экспериментах зарегистрировано снижение процента прироста массы после облучения в острой дозе. У мышей линии С57BL/6, как и линии СЗН, наблюдали восстановление прироста массы через 4 недели. У мышей линии 101 в опыте к 6 неделе прирост был выше, чем в контроле.

В поведенческом тесте «Открытое поле» в опытных группах у мышей линии СЗН двигательная активность значимо не изменялась, у мышей линии 101 наблюдали повышение вертикальной двигательной активности в течение 3х недель и уменьшение времени в покое через 1 неделю. К 6й неделе регистрировали снижение горизонтальной двигательной активности. В опытной группе мышей линии С57BL/6 наблюдали повышение вертикальной двигательной активности через 3 недели.

Таким образом, у мышей линии СЗН были найдены дизрегуляторные сдвиги на молекулярно-клеточном уровне после облучения. Мыши линии 101 на клеточном уровне показали себя более резистентными, а на органно-организменном – более радиочувстви-

тельными, чем линия СЗН и С57BL/6. У мышей линии С57BL/6 наблюдали повреждающее действие радиации на всех структурно-функциональных уровнях, однако к концу эксперимента эти патологические сдвиги нормализовались.

Следующей задачей был выбор методов для проведения исследований в ходе космического этапа работы. Информативным, с нашей точки зрения, оказался метод ЛКС.

2. НАЗЕМНЫЙ этап. В рамках подготовки к космическому эксперименту «Резистентность» были проведены наземные эксперименты – моделирование эффектов микрогравитации в течение 4 недель и гамма-облучения в малой дозе 0,05 Гр. В плазме крови мышей после окончания АОВ по сравнению с мышами, облученными малой дозой и контролем, регистрировали большее количество мелких частиц - 1,9, 8,4, 11,3 нм (Рис. 2).



Рисунок 2. Распределение по размерам частиц плазмы крови мышей через четыре недели после АОВ и в день облучения. По оси абсцисс – радиус частиц, нм. По оси ординат – вклад в светорассеяние, %.  $\neq - P_U < 0,05$  с группой, облученной 0,05 Гр.

В результате, относительно соответствующих контролей, биологические эффекты малых доз радиации приводят к метаболическому сдвигу плазмы крови в сторону повышения высокомолекулярных частиц III зоны, а эффекты микрогравитации – повышению доли частиц I зоны.

3. КОСМИЧЕСКИЙ этап. 19 апреля 2013 года космический биоспутник «БИОН-М» №1 был выведен на околоземную орбиту. Для изучения действия факторов космического полета наша лаборатория получила уникальный материал – плазму крови мышей, плечевые и тазовые кости, из которых были выделены клетки костного мозга. На ЛК-гистограммах плазмы крови мышей полетной группы (П) выявлено увеличение вклада в светорассеяние частиц

радиусом 50 и 165 нм. В группе наземного контроля (К) – увеличене доли частиц с радиусом 67- 123 нм. После реадaptации к виварным условиям содержания в течение 7 дней зафиксировано снижение отличий в распределении частиц плазмы крови животных опытной группы от контрольных значений.

При оценке изменений субфракционного состава плазмы крови мышей методом ЛКС, содержащихся в биоблоках (К), выявили повышение частиц крупного гидродинамического радиуса (67-165 нм), для группы, облученной малой дозой (0,05 Гр) – увеличен вклад более высокомолекулярных частиц (165-400 нм). При моделировании микрогравитации (АОВ) наблюдали увеличение процента низкомолекулярных частиц. Суммарный вклад всех факторов космического полета (П) привел к повышению частиц среднего размера в области 30-60 нм (Рис. 3).

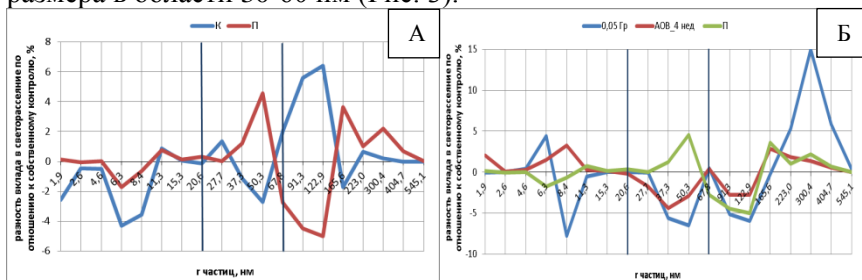


Рисунок 3. ЛК-гистограмма разности вклада в светорассеяние частиц плазмы крови мышей опытных групп по отношению к собственному контролю. А – сравнение ЛК-спектров полетной группы и наземного контроля. Б – сравнение ЛК-спектров полетной группы и групп наземного этапа. По оси абсцисс – радиус частиц, нм. По оси ординат – вклад в светорассеяние, %.

Длительное пребывание человека в космосе приводит к увеличению частоты хромосомных aberrаций, изменению числа клеток крови, индукции различных мутационных событий [Митрикас В.Г. и др., 2000]. Работа с КKM мышей позволила использовать явление PAO как нагрузочный тест для оценки адаптационных возможностей клеток. Уменьшение количества повреждений при последовательном действии двух этих доз (АД+ПД) по сравнению с эффектами ПД демонстрирует развитие PAO, вследствие чего происходят такие изменения как снижение уровня цитогенетических нарушений, повышение выживаемости клеток. Спонтанный уровень апоптоза без дополнительного облучения в исследуемых группах



достоверно не различался. В результате изучения индукции РАО было обнаружено достоверное снижение процента ядер с апоптозом в ККМ мышей только в полетной группе (Рис. 4А). После 7-ми дневной реадаптации индукция РАО сохранена, но в меньшей степени (Рис. 4Б).

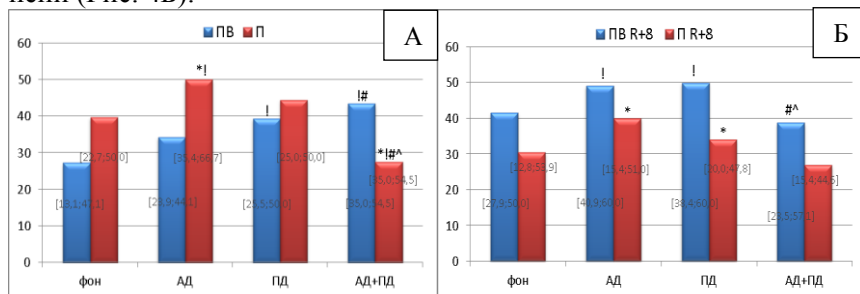


Рисунок 4. Величина апоптотического индекса в ККМ мышей при постановке схемы РАО. А – сравнение полетной группы с синхронным виварным контролем, Б - сравнение полетной группы с реадаптацией с синхронным виварным контролем. По оси абсцисс – доза облучения. По оси ординат – АИ в группе, %. \* -  $P_U < 0,05$  с контрольной группой, ! -  $P_U < 0,05$  с фоном, # -  $P_U < 0,05$  с АД, ^ -  $P_U < 0,05$  с ПД. Нижние и верхние квартили обозначены в скобках на гистограмме.

Таким образом, хроническое воздействие факторов космического полета в течение 30 суток вызвало развитие РАО, который отсутствовал в контрольных группах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе работы были зафиксированы изменения на всех изученных уровнях организации (Табл. 2). Большинство сдвигов носило однонаправленный характер, отличаясь между исследуемыми линиями по степени выраженности, времени проявления и длительности периода до восстановления. В ряде случаев межлинейные различия в генетическом профиле соотносились со степенями выраженности измеряемых показателей. Повышенная экспрессия генов системы детоксикации и репарации, характерная для линии СЗН, возможно, была причиной менее тяжелых повреждений на молекулярном, органном и организменном структурно-функциональных уровнях по сравнению с мышами линии 101. У мышей линии 101 защитная реакция проявляется в повышение

функциональной активности системы апоптоза. В настоящей работе: на органно-организменном уровне мыши линии 101 показали себя более радиочувствительными. Для мышей линии C57BL/6 характерен другой механизм радиационной защиты. У данной линии большее число высокоэкспрессируемых генов-активаторов иммунного надзора по сравнению с мышами линии СЗН, что могло повлиять на восстановление пострадиационных изменений к концу эксперимента. Повышенная экспрессия генов, вовлеченных в активацию и пролиферацию лимфоцитов крови (Prkcd, Slfn9, Il4ra, Klf2, Itk, Mapk14) могла повлиять на восстановление численности лимфоцитов к концу эксперимента.

Таблица 2.Изменения на разных структурно-функциональных уровнях после острого облучения в дозе 7,5 Гр по сравнению с контролем через 6 недель

линия мышей	ЛКС	ИСЛК	Цитометрия	Гистология	Вес	Поведение
СЗН/SnY	–	±	–	–	+	=
101/HY	–	=	±	–	±	–
C57BL/6J	±	±	±	–	+	=

= - без изменений; + - нормализация; ± - тенденция к нормализации; – - без нормализации.

Облучение организма приводит к значительным изменениям в образовании белков клетками, регистрируемыми с помощью протеомного анализа [RithidechK.N. et al., 2014]. Интегральным дополнительным методом, в условиях реализации космического эксперимента, может служить метод ЛКС. Выявленные этим методом метаболические сдвиги на уровне плазменного гомеостаза крови мышей являются отражением изменений, происходящих под действием факторов космического полета и при их моделировании. Установленное снижение АИ в ККМ может свидетельствовать о проявлении адаптации при дополнительной радиационной нагрузке ККМ мышей полетной группы. Снижение апоптоза в короткие сроки после облучения позволяет сохранить оптимальное количество клеток для поддержания их функциональной активности.

Полученные результаты вносят вклад в понимание процессов, проходящих в организме в ходе космического полета, и могут быть

использованы для прогноза восстановления организма после длительных космических полетов.

## **ВЫВОДЫ**

1. В опытах на мышах линий, различающихся по радиочувствительности, показано, что предложенная система тестов позволяет комплексно оценивать радиочувствительность организма на разных уровнях.

2. У мышей трех исследуемых линий при облучении зафиксировано возрастание индекса сдвига лейкоцитарной крови (у радиорезистентных C3H/3SnY и C57BL/6JY достигающее уровня статистической значимости), что свидетельствует о наличии признаков воспалительной реакции и нарушения иммунологической реактивности организма.

3. Метод лазерной корреляционной спектроскопии информативен для исследования плазмы крови в условиях космического эксперимента.

4. В ходе наземных экспериментов с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии выявлено, что острое облучение гамма-радиацией в дозе, эквивалентной полетной, приводит к возрастанию содержания высокомолекулярных частиц плазмы крови (с пиком 300 нм), а эффекты микрогравитации – к повышению вклада в светорассеяние низкомолекулярной фракции (с пиком 8 нм) относительно соответствующих контролей.

5. Сочетанное действие факторов космического полета приводит к изменениям в распределении частиц плазмы крови. Наряду с характерными для действия радиации и микрогравитации эффектами зафиксировано возрастание вклада в светорассеяния частиц с пиком 50 нм. После реадaptации животных к земным условиям в течение 7 дней выявлено снижение отличий в распределении частиц плазмы крови животных полетной группы от контроля.

6. Последовательная радиационная нагрузка в 0,05 и 0,5 Гр на клетки костного мозга мышей в послеполетный период вызывала снижение доли клеток с апоптозом в полетной группе по сравнению с наземным контролем. Это свидетельствует о том, что доза, накопленная мышами в течение полета, выступала как фактор, стимулирующий механизмы репарации повреждений ДНК и процессы элиминации клеток со значительными повреждениями.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Медведева Ю.С.**, Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Озерова М.А., Бобе А.С., Содбоев Ц.Ц., Антипов А.А., Карганов М.Ю. Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение // Биомедицина. – 2013. – №2. – С. 61-73.

2. Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., **Медведева Ю.С.**, Черепов А.Б., Карганов М.Ю. Динамика изменения физиологических показателей мышей с различной радиочувствительностью после острого гамма – облучения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 2. – С.150-154.

3. Alchinova I., Arkhipova E., **Medvedeva Yu.**, Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M. The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals // American Journal of Life Sciences.–2015. – Vol. 3(3) – P. 5-12.

4. **Medvedeva Yu.**, Arkhipova E., Alchinova I. The effects of gamma-irradiation in sub-lethal doses in mice with different radiosensitivity // American Journal of Life Sciences. – 2015. – Vol. 3 (1-2). – P.13-17.

5. Медведева Ю.С., Яковенко Е.Н., Алчинова И.Б. Оценка радиационно-индуцированного апоптоза в клетках костного мозга и сдвигов в составе плазмы крови мышей после экспозиции на субмагнитосферной орбите (биоспутник БИОН-М №1) // Патогенез. – 2016. – Т. 14, №2. – С. 38-42.

6. **Медведева Ю.С.**, Вялкина М.В. Оценка апоптоза в клетках костного мозга мышей после экспозиции на субмагнитной орбите (БИОН-М1) // DiscoveryScience. – 2016: сборник конкурсных работ международного интеллектуального конкурса студентов и аспирантов. Россия, Москва, 25 апреля 2016 г. / под ред. проф. А. Григорьева. М.: РусАльянс Сова, 2016. – С. 56-62.

7. Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., **Медведева Ю.С.**, Ивин Ю.Ю., Карганов М.Ю. – Дифференциация клеточно-метаболических эффектов у мышей / В кн.: Космический научный проект «Бион-М1»: медико-биологические эксперименты и исследования / Под ред. А.И. Григорьева. – М.: ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 2016. – 624 с. – С.427-435.

### Тезисы:

1. **Медведева Ю.С.**, Озерова М.А., Архипова Е.Н. Межлинейные различия в реакциях системы крови мышей трех линий на острое облучение // Студенческой конференция МВА им.

К.И.Скрябина «Наука глазами студентов»: тезисы доклада. Москва, ноябрь 2011 г. – С. 56-61.

2. **Medvedeva Yu.**, Arkhipova E., Alchinova I., Bobe A., Cherepov A., Karganov M. Peculiarities of organism's response to acute gamma irradiation in mice of different strains // Programme and abstract book of 20th Euroconference «From Death to Eternity». Rome, Italy, 14-17 September, 2012. – P. 177.

3. **Медведева Ю.С.**, Архипова Е.Н. Полисистемное исследование радиочувствительности мышей для проведения космического эксперимента «БИОН-М»№1 // IV Конференция молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология»: сборник трудов. Москва, 20-21 ноября 2013 г. – М.: Издательство «Перо». – 2013. – С. 20-21.

4. **Медведева Ю.С.**, Архипова Е.Н. Информативность различных методов тестирования радиочувствительности для проведения космического эксперимента «БИОН-1М» // V Международная научно-практическая конференция «актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины»: тезисы доклада. Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013 г. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета – С. 99-100.

5. Karganov M., Shenkman B., Sychev V., Arkhipova E., **Medvedeva U.**, Alchinova I. Differentiation of changes in serum homeostasis of laboratory animals after exposure on a BION-M1 satellite // In abstract book of 40th Scientific Assembly “COSPAR Moscow 2014”, Life science as related to space (F), Genetic, epigenetic and metabolic changes in spaceflight and simulated spaceflight environment (F 4.6). Moscow, 2-10 Aug. 2014. – P. 7-14.

6. **Medvedeva Yu.**, Arkhipova E. Selection criteria of laboratory animals for experimental design // In abstract book of Rus-LASA – ICLAS International Conference “Science-based assessment of laboratory animal welfare”. SaintPetersburg, Russia, 17-19 November 2014. – P. 94.

7. Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., **Медведева Ю.С.**, Шенкман Б.С., Карганов М.Ю. Изменения в сывороточном гомеостазе и интенсивности апоптоза у лабораторных животных после экспозиции на спутнике «Бион-М1» // IV Международная междисциплинарная конференция «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций»: материалы конференции. Москва, 17-18

сентября, 2015 г. – М.: ФГБНУ "НИИНФ им. П.К. Анохина", 2015 – С. 33-37.

8. Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., **Medvedeva Yu.**, Baranov V. Radioadaptive response and apoptosis in bone marrow cells of mice after space flight // Programme and abstract book of 23rd conference of the European Cell Death Organization «Death pathways and beyond». Geneva, Switzerland, 7-10 October 2015. – P. 28.

9. **Медведева Ю.С.**, Вялкина М.В. Генетически обусловленная радиочувствительность организма мышей на молекулярно-клеточном уровне // VII международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем»: сборник тезисов докладов. Звенигород, 14-18 ноября 2016 г. – С. 44.

### **Polysystemic evaluation of genetically determined radiosensitivity of the body (experimental study)**

Our aim was to evaluate at different levels the radiation-induced changes in mice with different genetically determined radiosensitivity and to test of methodological approaches at the cellular and molecular levels in a space experiment. Polysystemic analysis of the sensitivity of C3H/SnY, C57BL/6JY, and 101/HY mice to  $\gamma$ -radiation in an acute dose of 7.5 Gy was performed at the molecular, cellular, organ, and body levels. In some cases, the differences in the genetic profile between mouse lines were compared with the magnitude of the analyzed parameters.

Laser correlation spectroscopy (dynamic light scattering), an integral technique allowing detection of shifts in the serum or plasma homeostasis, was applied at the ground and space stages of the experiments. Acute  $\gamma$ -irradiation in a dose of 0.05 Gy (equivalent to absorbed dose during space mission) increased the fraction of high-molecular-weight particles, while modeling of microgravity was followed by accumulation of low-molecular-weight particles. The integral effect of all space flight factors consisted in an increase in the fraction of medium-sized (30-60 nm) particles.

Successive irradiation of mouse bone marrow cells in doses of 0.05 and 0.5 Gy during the postflight period reduced the fraction of apoptotic cells in the space flight group in comparison with the ground control. This suggests that the dose accumulated during the space mission acted as a factor stimulating the mechanisms of DNA reparation and elimination of seriously damaged cells.