

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**ПРОБЛЕМЫ
ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И РЕПАРАЦИИ
ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ**

Международная конференция

Дубна, 30–31 мая 2018 г.

Тезисы докладов

Дубна 2018

Оргкомитет:

Председатель:

Красавин Е. А., д. б. н., чл.-корр. РАН, директор ЛРБ ОИЯИ, председатель
Научного совета РАН по радиобиологии

Заместители председателя:

Гребенюк А. Н., д. м. н., проф., зам. директора по научной работе ООО
«СпецМедТехника»

Рождественский Л. М., д. б. н., зав. лабораторией ФМБЦ им. А. И. Бурназяна
ФМБА России

Члены оргкомитета:

Бушманов А. Ю., д. м. н., проф., первый зам. генерального директора ФМБЦ
им. А. И. Бурназяна ФМБА России

Газиев А. И., д. б. н., проф., ИТЭБ РАН, президент Радиобиологического
общества РАН

Гладких В. Д., д. м. н., проф., зам. директора по научной работе
НПЦ «Фармзащита» ФМБА России

Драчев И. С., д. м. н., проф., начальник управления ГНИИИ военной медицины
МО РФ

Иванов А. А., д. м. н., проф., зав. лабораторией ГНЦ ИМБП РАН

Кошлань И. В., к. б. н., ученый секретарь ЛРБ ОИЯИ

Легеза В. И., д. м. н., проф., в. н. с. НИЛ (радиационный регистр) НИЦ ВМА
МО РФ

Романович И. К., д. м. н., проф., чл.-корр. РАН, директор СПбНИИ
радиационной гигиены Роспотребнадзора

Симбирцев А. С., д. м. н., чл.-корр. РАН, научный руководитель ГосНИИ особо
чистых биопрепаратов ФМБА России

Филимонова М. В., д. б. н., зав. лабораторией МРНЦ им. А. Ф. Цыба —
филиала НМИРЦ Минздрава России

Ушаков И. Б., д. м. н., академик РАН, г. н. с., ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА
России

Секретарь:

Найдич В. И., к. х. н., ученый секретарь Научного совета РАН по радиобиологии

Проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях:
П78 Тезисы докл. междунар. конф. (Дубна, 30–31 мая 2018 г.). — Дубна: ОИЯИ,
2018. — 181 с.

ISBN 978-5-9530-0489-3

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Аклеев А.А., Блинова Е.А., Долгушин И.И.</i> Пролиферативная активность лимфоцитов и показатели иммунного статуса человека в отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия.	7
<i>Аксенова Н.В., Сидоров Д.А., Симбирцев А.С., Гребенюк А.Н.</i> Экспериментальное изучение противолучевой эффективности рекомбинантного интерлейкина-1 β при различных видах лучевых воздействий.	10
<i>Антушевич А.Е., Ярцева А.А., Климов А.Г., Сидоров Д.А., Гребенюк А.Н.</i> Препараты окисленного глутатиона как перспективные противолучевые средства.	13
<i>Арутюнян Р.М., Оганесян Г.Г., Григорян Б.А., Цаканова Г.В., Арутюнян С.Г., Арутюнян Т.А., Бабаян Н.С.</i> Оценка повреждений и репарации ДНК при облучении сверхкороткими импульсами ускоренных электронов.	16
<i>Беляев И.К., Жорова Е.С., Парфенова И.М., Тищенко Г.С.</i> Нереализованные возможности и нерешённые проблемы комплексной терапии поражений радиоактивными веществами.	19
<i>Бударков В.А., Грехова Н.В.</i> Маркеры лечебного действия продигозана при острой лучевой болезни овец.	22
<i>Васильев Ю.М.</i> Перспективы разработки биопрепаратов и иммунофармакологических средств для обеспечения химической защиты и репарации при радиационных воздействиях.	25
<i>Власова О.А., Багнаев И.В., Афонькина Е.А., Никифоров А.С., Кравцов И.С.</i> Оценка влияния генотерапевтического препарата, кодирующего кроветворные ростовые факторы SCF, G-CSF и FLT-3l, на гематологические показатели мышей.	27
<i>Восканян К.Ш., Рзянина А.В., Мицын Г.В., Гаевский В.Н.</i> Радиозащитное действие лазерного излучения с длиной волны 532 нм на клетки фибробластов.	30
<i>Герасименя В.П., Захаров С.В., Трезвова А.В., Милевич Т.И.</i> Инновационные пищевые концентраты мицелия вешенки обыкновенной, обогащенные природными антиоксидантами, «Грибной чудодей [®] » и «Тайна вешенки [®] » для коррекции пострадиационных нарушений, вызванных различными дозами γ – облучения.	33
<i>Гладких В.Д., Гребенюк А.Н.</i> Медикаментозные средства профилактики и ранней экстренной терапии радиационных поражений. Состояние и перспективы развития.	36
<i>Грицук А.И., Свергун В.Т., Коваль А.Н., Сергеенко С.М.</i> Изучение влияния скармливания загрязненной ¹³⁷ Cs пищи и комплекса витаминов А, Е, С на показатели митохондриального дыхания скелетных мышц белых крыс.	39
<i>Грубская Л.В., Кленко А.В., Канюк С.Н., Гавриш Т.И., Андрейченко С.В., Гудков И.Н.</i> Пути репарации лучевых повреждений ДНК в сперматозоидах животных.	42
<i>Шарапов М.Г., Новоселов В.И., Брусков В.И., Гудков С.В.</i> Исследование радиозащитных свойств белка-антиоксиданта пероксиредоксин 2.	45

<i>Драчев И.С., Лезеза В.И., Селезнев А.Б., Супрунова Е.Б.</i> Современные средства профилактики и купирования диспепсических проявлений первичной реакции на облучение.	48
<i>Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М., Сорокина С.С., Романченко С.П., Смирнова Е.Н., Шемяков А.Е., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.</i> Исследование свойств F1 поколения мышей, адаптированных He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями <i>in vivo</i> .	52
<i>Евстратова Е.С., Петин В.Г.</i> Участие процессов восстановления в проявлении генетической нестабильности клеток после действия редко- и плотноионизирующих излучений.	55
<i>Егорова Т.С., Шляков А.М., Чурилова И.В., Конторина Н.В., Прокофьева Л.А.</i> Разработка препаратов для терапии обширных термических ран, осложненных бактериальными инфекциями, различной этиологии, в том числе, вызванных радиационными поражениями .	58
<i>Ермакова О.В., Велегжанинов И.О., Ермакова А.В., Раскоша О.В.</i> Влияние ионизирующего излучения в малых дозах на пролиферацию клеток млекопитающих <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .	61
<i>Ефремова Ю.И., Шинкорова З., Лиэрова А., Еличова М., Навратил Л.</i> Влияние площади облучаемой поверхности тела при лазерной терапии гамма-облученных мышей.	64
<i>Жаковко Е.Б., Красильников И.И.</i> Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности визомитина – лекарственного препарата на основе антиоксиданта нового типа.	66
<i>Жирник А.С., Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю.</i> Повышение чувствительности опухолевых клеток человека к действию гамма-излучения с помощью никлозамида	69
<i>Кадукова Е.М., Куц Ф.И.</i> Особенности поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» и возможность их модификации 1-триптофаном при сочетанном воздействии факторов радиационной и нерадиационной природы.	72
<i>Кобатов А.И., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Гуреева Е.А., Кутник И.В.</i> Поддержание колонизационной резистентности* организма человека как способ снижения медицинских рисков при выполнении космического полета.	75
<i>Авдеева Л.В., Евстюхина Т.А., Кольтовер В.К., Королев В.Г., Кутлахмедов Ю.А.</i> Магнитные изотопы: новый подход к созданию новых противолучевых средств.	78
<i>Краев С.Ю., Драчёв И.С., Селезнёв А.Б.</i> Изучение возможности снижения побочного действия цистамина при его ингаляционном введении.	81
<i>Красильников И.И.</i> Перспективные направления исследований, связанных с разработкой радиопротекторов.	84
<i>Кузьмина Е.А., Борейко А.В., Дубничкова М., Ильина Е.В., Кожина Р.А., Тиунчик С.И., Чаусов В.Н.</i> Модифицирующее влияние различных форм липида а на формирование двунитевых разрывов днк при γ -облучении.	87
<i>Куликов А.В., Архитова Л.В., Мндлян Е.Ю., Гаврилюк В.Б., Брусков В.И.</i> Можно ли трансплантацией иммунокомпетентных тканей компенсировать последствия радиационного облучения?	90

<i>Лебедев В.Г., Насонова Т.А., Лырщикова А.В., Дешевой Ю.Б., Добрынина О.А., Мороз Б.Б.</i> Исследование влияния стромально-васкулярной фракции жировой ткани при клеточной терапии тяжелых местных лучевых поражений в эксперименте.	93
<i>Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Драчев И.С., Резник В.М.</i> Классификация радиомитигаторов – новый взгляд на проблему.	96
<i>Ляхова К.Н., Колесникова И.А., Северюхин Ю.С., Утина Д.М., Иванов А.А., Буденная Н.Н., Молоканов А.Г., Красавин Е.А.</i> Доклиническое изучение нейропептида «семакс» при лучевой патологии.	99
<i>Макарчук В.М., Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Филимонов А.С., Суринова В.И., Чеснакова Е.А., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Измestьева О.С., Лычагин А.А.</i> Изучение противолучевых свойств пос-ингибитора t1023 при фармакодинамическом взаимодействии с мексамином.	102
<i>Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В., Симбирцев А.С., Веселова О.М.</i> Комбинированное применение рекомбинантных флагеллина и интерлейкина-1 бета при радиационных воздействиях.	105
<i>Орадовская И.В., Васильев А.А., Феоктистов В.В., Никонова М.Ф., Викулов Г.Х.</i> Особенности изменений иммунного статуса (ис) персонала горно-химического комбината (гхк) в условиях контакта с химическими факторами (хф) профвредности (пв).	108
<i>Пряхин Е.А., Тряпицына Г.А., Тухай М.В., Шапошникова И.А., Остроумов Ю.И., Аклеев А.В.</i> Влияние липосомального препарата белков рчАФП и рчГКСФ на стволовые клетки кожи.	112
<i>Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В., Глухов А.И., Родина А.В., Москалева Е.Ю.</i> Повышение выживаемости облученных нейральных стволовых клеток мыши под действием факторов, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками.	115
<i>Ремизов Д.В., Кондаков А.Ю., Степанов А.В., Пономарев Д.Б., Тихомиров П.В.</i> Эффективность ранозаживляющей мази на основе тамерита при комбинированном радиационно-механическом поражении (экспериментальное исследование).	117
<i>Рождественский Л.М.</i> Проблемные вопросы разработки противолучевых средств.	119
<i>Самохвалов И.М., Селезнёв А.Б., Носов А.М.</i> Перспективные методы хирургического лечения комбинированных радиационно-механических поражений.	122
<i>Самсонова А.С., Филимонова М.В., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И., Филимонов А.С., Макарчук В.М., Чеснакова Е.А., Суринова В.И.</i> Оценка способности соединения t1023 к селективной защите нормальных тканей на экспериментальной модели карциномы эрлиха.	124
<i>Свентицкая А.М., Шедько Е.Д.</i> Исследование эффективности радиопротектора (2-(нафтален-1-ил,метил)-4,5-дигидро-1h-имидазол) на модели комбинированного радиационно-механического поражения.	127
<i>Семенович К.С.</i> Нормативно-правовые аспекты регистрации радиозащитных лекарственных препаратов в российской федерации.	130
<i>Симбирцев А.С.</i> Рекомбинантные цитокины и иммуномодуляторы в аспекте радиационной и химической безопасности.	134

<i>Смолягин А.И., Чайникова И.Н., Фролов Б.А., Твердохлиб В.П.</i> Эффекты барокамерной адаптации к периодическому действию гипоксии при лучевом поражении экспериментальных животных.	136
<i>Тимохина Н.И., Сушко С.Н., Кадукова Е.М., Веялкина Н.Н., Гончаров С.В., Ноздрев Д.А., Трухоновец В.В.</i> Экспериментальная оценка профилактики и восстановления радиационных нарушений в организме средствами на основе водных экстрактов грибов.	139
<i>Тряпицына Г.А., Пряхин Е.А., Атаманюк Н.И., Остроумов Ю.И., Семенкова Л.Н., Аклеев А.В.</i> Оценка влияния альфа-фетопротеина на течение лучевого ожога кожи у мышей.	142
<i>Ушаков И.Б., Васин М.В.</i> Фармакохимическая защита в дальнем космосе: современный взгляд.	146
<i>Федоров В.П., Ушаков И.Б.</i> Этанол как фактор, модифицирующий радиационное поражение мозга.	149
<i>Филимонова М.В., Самсонова А.С., Шевченко Л.И., Корнеева Т.С., Макарчук В.М., Чеснакова Е.А., Суринова В.И., Ульяненко С.Е., Филимонов А.С.</i> Ингибиторы pos как средства профилактики осложнений лучевой терапии.	152
<i>Филимонова М.В., Филимонов А.С.</i> Современные перспективы разработки и внедрения отечественных противолучевых лекарственных средств.	155
<i>Филимонова М.В., Евстратова Е.С., Макарчук В.М., Шевченко Л.И., Филимонов А.С., Петин В.Г.</i> Участие процессов восстановления в механизме радиозащитного действия химических соединений.	158
<i>Хвостунов И.К., Крылов В.В., Родичев А.А., Шепель Н.Н., Кочетова Т.Ю., Коровчук О.Н., Пятенко В.С., Хвостунова Т.И.</i> Роль фактора репарации лучевых повреждений при оценке радиационного воздействия на организм больных дифференцированным раком щитовидной железы в процессе радиойодтерапии.	161
<i>Чеснакова Е.А., Филимонова М.В., Макарчук В.М., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Суринова В.И., Шевченко Л.И., Филимонов А.С., Ульянова Л.П.</i> Возможность применения ингибитора pos в качестве средства профилактики и терапии комбинированных лучевых поражений.	164
<i>Чешик И.А., Никитин А.Н., Сухарева Д.В.</i> Использование эффективных микроорганизмов для снижения радиационных рисков.	167
<i>Чурилова И.В., Терехов О.В., Пасов В.В., Леонова Н.В., Дроздова Ю.И., Егорова Д.А.</i> Радиопротекторные свойства препарата рексод®.	170
<i>Шуватова В.Г., Кувырченкова А.П., Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю.</i> Антигельминтный препарат никлозамид, как перспективный радиосенсибилизатор опухолевых стволовых клеток. Возможные механизмы действия.	173
<i>Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Раева Н.Ф., Незнанова М.В., Засухина Г.Д.</i> Перспективы использования молекул различных видов рнк как биомаркеров в оценке эффективности действия радиозащитных средств.	176
<i>Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Ляхова К.Н., Утина Д.М., Виноградова Ю.В., Колесникова И.А., Островский М.А.</i> Изменение в составе бисретиноидов в сетчатке и ретинальном пигментном эпителии глаза мыши при действии ионизирующего излучения.	179

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ И ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

А.А. Аклеев^{1,2}, Е.А. Блинова^{2,3}, И.И. Долгушин¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия,

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

e-mail: andrey.akleev@yandex.ru

Резюме. В отдалённые сроки у облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи (средняя доза облучения – $1,03 \pm 0,14$ Гр, диапазон вариабельности: 0,01-3,65 Гр) с повышенной экспрессией белка Chk 2 зарегистрировано снижение содержания в периферической крови абсолютного количества $CD8^+$ -лимфоцитов, уровней сывороточных ИЛ-2 и ИЛ-6, а также повышение содержания иммуноглобулинов классов А и G в сыворотке крови.

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, лимфоцит периферической крови, клеточный цикл, пролиферация, иммунный статус.

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF LYMPHOCYTES AND PARAMETERS OF IMMUNITY STATUS OF MAN AT LATER TIME POINTS AFTER CHRONIC RADIATION EXPOSURE

A.A. Akleyev^{1,2}, E.A. Blinova^{2,3}, I.I. Dolgushin¹

¹Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia, e-mail: andrey.akleev@yandex.ru

²Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Chelyabinsk, Russia

³Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Summary. At later time points after chronic radiation exposure in residents of the settlements located in the basin of the Techa River (mean exposure dose was 1.03 ± 0.14 , individual values varied over the range 0.01-3.65 Gy), decrease in the absolute number of $CD8^+$ -lymphocytes, in the level of serum cytokines IL-2 and IL-6 as well as increase in the level of serum immunoglobulins A and G were noted in the peripheral blood of individuals who had increased expression of Chk 2 protein.

Key words: chronic radiation exposure, peripheral blood lymphocyte, cell cycle, proliferation, immunological status.

Известно, что причиной вторичных иммунодефицитов после острого радиационного воздействия в высоких дозах является интерфазная гибель иммунокомпетентных клеток и их предшественников, которая реализуется достаточно рано после облучения. Наибольшей радиочувствительностью обладают стволовые кроветворные клетки, костномозговые клетки-предшественники, а также зрелые лимфоциты [1]. Механизмы отдалённых изменений иммунитета, в особенности, после

хронического низкоинтенсивного облучения, остаются практически неизученными до настоящего времени. Предполагается, что реакции иммунокомпетентных клеток и тканей на хроническое радиационное воздействие связаны не столько с цитотоксическим действием радиации (как это имеет место при остром облучении в высоких дозах), сколько с их разнообразными функциональными ответами. Хорошо известно, что ионизирующая радиация способна вызывать задержку клеточного цикла, которая позволяет значительно повысить эффективность репарации первичных радиационных повреждений ядерной ДНК. Как правило, задержка вступления облучённых клеток в митоз возникает в результате остановки клеточного цикла на стадиях G1 или G2 в сверхточных точках G1/S и G2/M, при этом продолжительность остановки зависит от дозы облучения [1]. Ранее было показано, что у жителей прибрежных сёл реки Течи, подвергшихся хроническому облучению, в отдалённые сроки чаще регистрировалась задержка клеточного цикла среди лимфоцитов периферической крови (ЛПК) по сравнению с необлучёнными лицами [2].

Целью работы было исследование зависимости основных показателей системного иммунитета и пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови от состояния клеточного цикла лимфоцитов в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз облучения красного костного мозга (ККМ).

В исследование был включён 141 житель прибрежных сёл реки Течи (96 женщин – 68,1% и 45 мужчин – 31,9%, средний возраст на момент обследования – $69,5 \pm 0,5$ лет), подвергшийся хроническому радиационному воздействию в результате её загрязнения жидкими радиоактивными отходами ПО «Маяк». Важно отметить неравномерность распределения поглощённой дозы по организму облучённых людей. Наибольшие дозы облучения пришлись на ККМ вследствие значительного поступления в организм остеотропного ^{90}Sr . Основную группу составил 31 облучённый человек, у которых отмечалась повышенная частота встречаемости лимфоцитов с блоком клеточного цикла (БКЦ) ($\geq 1\%$ лимфоцитов экспрессировали белок Chk2) [2]. Группа сравнения включала 110 облучённых людей, у которых частота лимфоцитов с БКЦ составляла менее 1%. Представители обеих групп проживали в сходных социально-экономических условиях и имели аналогичный характер медицинского обслуживания.

Количество лимфоцитов с БКЦ оценивалось методом проточной цитометрии по числу клеток, синтезирующих белок Chk2, который экспрессируется в сверхточной точке G1/S в ответ на двунитевые разрывы ядерной ДНК [3, 4]. Пролиферативную активность ЛПК оценивали также при помощи проточной цитометрии по экспрессии лимфоцитами белка Ki-67 [5]. Исследование системного иммунитета предполагало определение в крови количества иммунокомпетентных клеток с фенотипами: $\text{CD}19^+$, $\text{CD}3^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$, $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}16^+\text{CD}56^+$, $\text{CD}95^+$; оценку функциональной активности нейтрофилов и моноцитов крови (фагоцитарная, лизосомальная активность, интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма), а также уровней цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-1RA, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, КСФ-ГМ, КСФ-Г, ФНО α , ИНФ α , ИНФ γ) и иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови.

Результаты анализа показателей врождённого и адаптивного иммунитета позволили установить, что в отдалённые сроки после начала хронического облучения у лиц с повышенной частотой лимфоцитов с БКЦ отмечено снижение абсолютного количества $\text{CD}8^+$ -лимфоцитов при практически неизменном соотношении $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$. Хотя уровень $\text{CD}19^+$ -лимфоцитов у лиц сравниваемых групп не различался, содержание сывороточных иммуноглобулинов классов А и G у людей с повышенной частотой лимфоцитов с БКЦ было значительно выше. Существенных отличий со

стороны показателей врождённого иммунитета у представителей основной группы относительно группы сравнения не отмечалось. О компенсации зарегистрированного в основной группе лиц снижения показателей активности фагоцитоза моноцитов свидетельствует повышение у них общего количества моноцитов в крови. У лиц с повышенной частотой лимфоцитов с БКЦ отмечено значительное снижение уровней сывороточных ИЛ-2 и ИЛ-6. Зарегистрированное увеличение пролиферативной активности лимфоцитов у жителей прибрежных сёл реки Течи с повышенной экспрессией Chk2 в отдалённые сроки после начала хронического радиационного воздействия имеет, по-видимому, компенсаторный характер.

Таким образом, анализ состояния иммунитета у облучённых лиц с повышенной экспрессией белка Chk2 показал, что G1/S-блок клеточного цикла в ЛПК может влиять на адаптивный иммунитет. В частности, складывается впечатление о смещении баланса клеточного и гуморального иммунитета вследствие G1/S-блока клеточного цикла в ЛПК в сторону гуморального иммунного ответа. Также в рамках настоящего исследования не получено доказательств того, что G1/S-блок клеточного цикла в ЛПК в отдалённые сроки может приводить к развитию вторичного иммунодефицита у людей, подвергшихся многолетнему радиационному воздействию.

Список литературы

1. ICRP Publication 118. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Annals of the ICRP, Elsevier. 2012.

2. Маркина Т.Н., Веремеева Г.А., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Блок клеточного цикла и активность апоптоза лимфоцитов периферической крови (ЛПК), частота мутаций в генах TCR в отдалённые сроки у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Вопросы радиационной безопасности. 2011, № 1. С. 41-49.

3. Nyberg K.A., Michelson Rh. J., Putnam C.W., Weinert T.A. Toward maintaining the genome: DNA Damage and Replication Checkpoints // Annual Review of Genetics. 2002. Vol. 36. P. 617-656.

4. Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective // Genes and Development. 1996. Vol. 274. P. 1664-1672.

5. Lopez F., Belloc F., Lacombe F. [et al.] Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes // Cytometry. 1991. Vol. 12, № 1. P. 42-49.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОЛУЧЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ЛУЧЕВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Н.В. Аксенова¹, Д.А. Сидоров¹, А.С. Симбирцев², А.Н. Гребенюк^{1,3}

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ,

² ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, ³ ООО «Специальная и Медицинская Техника»,

Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nataaks@mail.ru

Резюме. В экспериментальных исследованиях на мышах и крысах изучена противолучевая активность рекомбинантного интерлейкина-1 β в качестве средства профилактики и ранней терапии лучевых поражений. Интерлейкин-1 β оказывает противолучевой эффект при различных вариантах лучевых воздействий. Механизм его противолучевого эффекта связан с выраженным влиянием на систему кроветворения, что проявляется увеличением пролиферативной активности клеток костного мозга.

Ключевые слова: облучение, интерлейкин-1 β , гемопоэз, колониеобразование, радиозащитный эффект

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTI-RADIATION EFFECTIVENESS OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-1 β IN DIFFERENT TYPES OF RADIATION EXPOSURE

N.V. Aksenova¹, D.A. Sidorov¹, A.S. Simbirtsev², A.N. Grebenyuk^{1,3}

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy,

² State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,

³ Special & Medical Equipment,

St. Petersburg, Russia

e-mail: nataaks@mail.ru

Summary. The anti-radiation activity of the recombinant interleukin-1 β as a means of prevention and early treatment of radiation injuries was studied in experiments on mice and rats. It has been shown that interleukin-1 β has an anti-radiation effect in different types of radiation exposure. The mechanism of its anti-radiation effectiveness is associated with a pronounced effect on the hematopoiesis system, which is manifested by an increase in the proliferative activity of bone marrow cells.

Key words: irradiation, interleukin-1 β , hemopoiesis, colony formation, radioprotective effect

Поиск новых средств медицинской противорадиационной защиты по-прежнему остается актуальной проблемой современной радиобиологии [2]. При этом большое внимание уделяется поиску и изучению лекарственных средств, способных стимулировать радиорезистентность организма и обладающих радиозащитной эффективностью при остром, пролонгированном и сочетанном облучении.

Цель исследования: изучение противолучевой активности рекомбинантного интерлейкина-1 β при различных вариантах радиационных воздействий.

Экспериментальные исследования выполнены на беспородных мышах, мышах линий BALB/c и CBA x C57B1 первого поколения массой 18-20 г и белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г. Общее относительно равномерное рентгеновское облучение мышей осуществляли на рентгенотерапевтической установке РУМ-17 при мощности дозы 54 Р/мин и на установке ИГУР-1 при мощности дозы 130 Р/мин.

Пролонгированное γ -облучение крыс с мощностью экспозиционной дозы 1 Р/мин проводили до накопления дозы 10 Гр, что соответствовало СД_{70-90/30}. Сочетанное внешнее и внутреннее радиационное воздействие моделировали путем инкорпорации крысам смеси радионуклидов ¹³⁷Cs и ⁹⁰Sr непосредственно после окончания внешнего γ -облучения в дозе 8 Гр (мощность дозы 1 Р/мин, время экспозиции 13 ч 20 мин). Учитывая вклад внешнего (80%) и внутреннего (20%) облучения суммарная доза за 30 сут эксперимента составила 10 Гр (СД_{70-90/30}).

Для изучения противолучевой эффективности интерлейкина-1 β при всех используемых моделях облучения препарат вводили за 24 ч до начала или через 1 ч после окончания радиационного воздействия, а в случае моделирования сочетанного облучения – через 1 ч после окончания внутрибрюшинного введения крысам рабочей смеси радионуклидов. Оценку эффективности интерлейкина-1 β в качестве средства профилактики и ранней патогенетической терапии лучевых поражений проводили путем анализа 30-ти суточной выживаемости. Влияние интерлейкина-1 β на динамику постлучевых изменений костномозгового кроветворения оценивали в методиках эндогенного и экзогенного колониеобразования, количество выросших на селезенках мышей колониеобразующих единиц подсчитывали на 9 сут после облучения.

В результате проведенных исследований было установлено, что при профилактическом (за 24 ч до облучения) и раннем лечебном (через 1 ч после воздействия) способах применения интерлейкин-1 β увеличивает выживаемость животных при остром облучении с мощностью дозы 54 Р/мин, при пролонгированном радиационном воздействии, а также при сочетанном лучевом поражении от внешнего и внутреннего облучения [3, 4]. В условиях внешнего γ -облучения с мощностью дозы 130 Р/мин как при профилактическом, так и при раннем лечебном применении рекомбинантный интерлейкин-1 β проявлял радиозащитное действие в отношении показателей выживаемости облученных мышей и практически не оказывал влияния на среднюю продолжительность жизни погибших животных [3].

Расчетное значение ФИД интерлейкина-1 β в условиях рентгеновского воздействия с мощностью дозы 54 Р/мин составило 1,15 для радиопротекторного эффекта препарата и 1,14 для его лечебной активности. ФИД препарата при его применении в качестве радиопротектора в условиях внешнего γ -облучения с мощностью дозы 130 Р/мин составил 1,13, а при использовании в качестве средства ранней патогенетической терапии радиационных поражений – 1,12.

В результате дальнейших исследований было установлено, что введение интерлейкина-1 β за 24 ч до или через 1 ч после облучения способствует снижению выраженности постлучевых нарушений костномозгового кроветворения и увеличению пролиферативной активности гемопоэтических клеток.

В условиях профилактического (за 24 ч до радиационного воздействия) применения при всех изученных дозах облучения рекомбинантный интерлейкин-1 β предотвращал снижение количества эндогенных КОЕ-С₉ у облученных мышей [1]. Статистически значимых отличий по сравнению с контролем данный показатель достигал при облучении животных в дозах 7,0 и 7,5 Гр (СД_{70-80/30}), а при действии доз 8,0 и 8,5 Гр (СД_{90-100/30}) только предварительное введение препарата позволяло обнаружить рост колоний на селезенках облученных мышей.

Высокую радиозащитную активность по показателям эндогенного колониеобразования интерлейкин-1 β проявлял и при его лечебном применении через 1 ч после радиационного воздействия в дозах от 5,5 до 8,5 Гр. При всех изученных дозах облучения интерлейкин-1 β предотвращал снижение числа эндогенных КОЕ-С₉ у облученных мышей, однако достоверные различия этого показателя по сравнению с

контролем регистрировались только после радиационного воздействия в дозах от 7,0 до 8,0 Гр [5]. Так, число КОЕ-С₉ при лечебном применении препарата превышало аналогичные значения группы сравнения при облучении в дозе 7,0 Гр почти в 1,5 раза, при облучении в дозе 7,5 Гр – в 2,6 раза, при облучении в дозе 8,0 Гр – в 4,75 раза.

Введение интерлейкина-1 β за 24 ч до радиационного воздействия позволяло в значительной степени предотвратить постлучевое снижение числа КОЕ-С₉, определяемых у облученных мышей в методике экзогенного колониеобразования, а радиозащитный эффект препарата в отношении клеток-предшественников проявлялся вне зависимости от линейной радиочувствительности мышей [1]. Так, у мышей линии BALB/c, получавших интерлейкин-1 β в качестве радиопротектора, количество колоний по сравнению с незащищенными облученными животными выросло в 2,8 раза и составило 42% от уровня интактных животных, а у мышей-гибридов F₁ (CBA x C57Bl) увеличилось в 4,3 раза и составило 29% от уровня интактных животных. Интересно и то, что уже само по себе введение интерлейкина-1 β существенным образом стимулировало рост колоний на селезенках интактных, то есть не подвергавшихся облучению, мышей. Особенно сильно это было выражено у наиболее радиочувствительных животных – мышей линии BALB/c: под влиянием препарата число экзогенных КОЕ-С₉ у них выросло более чем в 4 раза.

В ходе изучения функции экзогенного колониеобразования у облученных мышей-гибридов CBA x C57Bl было также установлено, что предварительное (за 20-30 мин до применения интерлейкина-1 β) введение животным рецепторного антагониста интерлейкина-1 полностью отменяет проявления защитного действия рекомбинантного интерлейкина-1 β в отношении клеток-предшественников гемопоэза. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости участия рецепторов к интерлейкину-1 в механизмах реализации радиопротекторной активности данного цитокина.

Таким образом, показано, что интерлейкин-1 β оказывает противолучевой эффект при различных вариантах лучевых воздействий. Механизм его противолучевого эффекта связан с выраженным влиянием на систему кроветворения, что проявляется увеличением пролиферативной активности клеток костного мозга.

Список литературы

1. Аксенова Н.В., Гребенюк А.Н., Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Сидоров Д.А., Тимошевский А.А. Радиопротекторная активность ИЛ-1 β в отношении клеток-предшественников гемопоэза // Мед. иммунология. 2003. Т. 5, № 5-6. С. 621-624.
2. Гладких В.Д., Баландин Н.В., Беловолов А.Ю., Гребенюк А.Н., Дружков А.В., Падалко С.В. Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиационных поражений / Под ред. В.Д. Гладких. М.: Комментарий, 2017. 304 с.
3. Гребенюк А.Н., Зацепин В.В., Аксенова Н.В., Сидоров Д.А., Тимошевский А.А. Влияние раннего терапевтического применения интерлейкина-1 β на выживаемость и костномозговое кроветворение облученных мышей // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2008. № 1 (21). Прил. С. 135-138.
4. Гребенюк А.Н., Мясников В.А., Зацепин В.В., Аксенова Н.В., Быков В.Н., Сидоров Д.А. Сравнительное изучение эффективности гепарина, интерлейкина-1 β , β -эстрадиола и индометофена в качестве радиопротекторов при остром облучении // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2011. № 4 (36). С. 101-104.
5. Grebenyuk A., Zatsepin V., Aksenova N., Timoshevsky A. Effects of early therapeutic administration of interleukin-1 β on survival rate and bone marrow haemopoiesis in irradiated mice // Acta Medica (Hradec Kralove). 2010. Vol. 53, N 4. P. 221-224.

ПРЕПАРАТЫ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ СРЕДСТВА

А.Е. Антушевич¹, А.А. Ярцева², А.Г. Климов², Д.А. Сидоров¹, А.Н. Гребенюк^{1,3}

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»,

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»,

³ ООО «Специальная и Медицинская Техника»,

Санкт-Петербург, Россия

e-mail: antu-anna@yandex.ru

Резюме. В экспериментах на белых беспородных мышах и в исследованиях на клеточной культуре А431 изучена противолучевая активность и возможный механизм фармакологического действия препаратов окисленного глутатиона. Показано, что противолучевой эффект препаратов окисленного глутатиона может быть обусловлен их способностью ускорять репаративные процессы в клетках костного мозга и восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов.

Ключевые слова: облучение, радиопротектор, окисленный глутатион, цитокины, рецепторы, эпидермальный фактор роста.

MEDICINALS OF THE OXIDIZED GLUTATHIONE AS PERSPECTIVE RADIOPROTECTIVE MEANS

A.E. Antushevich¹, A.A. Yartseva², A.G. Klimov², D.A. Sidorov¹, A.N. Grebenyuk^{1,3}

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy,

² St. Petersburg State Pediatric Medical University,

³ Special & Medical Equipment,

St. Petersburg, Russia,

e-mail: antu-anna@yandex.ru

Summary. Radioprotective activity and a possible mechanism of pharmacological action of oxidized glutathione medicinals was studied in experiments on white inbred mice and on cell culture A431. It was shown that the radioprotective effect of oxidized glutathione medicinals can be due to their ability to accelerate reparative processes in bone marrow cells and to restore the functionally active conformation of cytokine receptors.

Key words: irradiation, radioprotector, oxidized glutathione, cytokines, receptors, epidermal growth factor.

Вследствие расширения контактов с источниками ионизирующих излучений, возможности повторения аварийных ситуаций на объектах атомной энергетики, продолжения космических полетов риск переоблучения организма постоянно возрастает. Несмотря на разработку многочисленных лекарственных препаратов и биологически активных добавок для профилактики и лечения различных форм радиационных поражений, проблема поиска новых фармакологических средств противорадиационной защиты человека по-прежнему остается актуальной. В последние годы внимание исследователей обращено на применение в качестве противолучевых средств эндогенных регуляторов тиол-дисульфидного обмена, в частности фармакологическим средствам, содержащим окисленный глутатион [1–3].

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка противолучевой активности фармакологических препаратов, содержащих соли окисленного глутатиона.

Эксперименты выполнены на белых беспородных мышах-самцах массой 20–22 г. При моделировании острых радиационных поражений животных подвергали общему

однократному гамма-облучению на установке ИГУР-1 при мощности дозы 1,40–1,22 Гр/мин. Доза облучения составляла 7,3 Гр, что соответствовало летальной дозе в 80% при 30-ти суточном наблюдении ($LD_{80/30}$). Контроль поглощенной дозы проводили с помощью дозиметра ИД-11.

В качестве противолучевых средств была изучена активность трех фармакопейных препаратов: глутоксима, моликсана и литана. Препарат глутоксим является фармакологическим аналогом окисленного глутатиона; действующее вещество: бис-(γ -L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин динатриевая соль. Препарат моликсан – органическая соль дисульфида глутатиона и инозина; действующее вещество: инозина глицил-цистеинил-глутамат динатриевая соль (рибофуранозил-гипоксантин-аглицил-цистеинил-глутамата динатрия). Литан является композиция литиевой соли дисульфида глутатиона и комплексного соединения палладия и меди; действующее вещество: бис-(γ -L-глутамил)-L-цистеинил-глицина дилитиевая соль : цис-диаминодихлорпалладий : медь двухлористая. Препараты вводили мышам внутрибрюшинно в следующие сроки: 1 – через 1 ч после облучения; 2 – через 1ч, 24ч и 48ч после радиационного воздействия; 3 – через 1, 24, 48 и 72 ч после облучения.

Проведенные исследования показали, что как однократное, так и многократное (курсовое) введение глутоксима способствует сохранению жизни 60-70% облученным животным. Необходимо отметить, что эффективность вышеназванных препаратов сравнения (моликсана и литана) была, практически, такой же, как и у глутоксима.

Противолучевой эффект препарата глутоксим обусловлен ускорением репаративных процессов в клетках костного мозга и восстановлением необходимого пула кроветворных (стволовых и коммитированных) клеток костного мозга, что подтверждается данными об увеличении почти в 2,5-3 раза количества стволовых клеток (по тесту эндогенных колоний) и росту в среднем на 300% интенсивности включения меченного ^3H -тимидина в ДНК клеток костного мозга. Сравнимый гемостимулирующий эффект выявлен у моликсана и в больше степени у литана [4–6].

Проведенные в дальнейшем исследования показали, что все изученные препараты окисленного глутатиона при курсовом применении после облучения позволяют нормализовать процессы пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток, в первую очередь миелобластов и мегакариобластов, что обеспечивает восполнение пула клеток периферической крови: не только лейкоцитов, но и тромбоцитов [4–6]. Из изученных соединений наиболее эффективным средством коррекции лучевого миелодиспластического синдрома был препарат литан, несколько меньший, но все же значимый эффект обнаруживался также у моликсана и глутоксима.

Следует отметить, что основной компонентой изучаемых препаратов явился окисленный глутатион (GSSG), фармакологическим аналогом которого явился препарат глутоксим. Механизмы фармакологической активности препарата глутоксим, схожие с действием ряда цитокинов, остаются до конца не выясненными. В этой связи на клетках A431 изучалось действие препарата глутоксим на активность рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), контролируемые им транскрипционные факторы STAT1 и STAT3, Ras-зависимые сигнал передающие MAP-киназы – ERK1,2, в сравнении с GSSG и эпидермальным фактором роста (EGF).

EGFR-рецепторная тирозинкиназа проявляла сродство к EGF и активность при образовании димера за счет дисульфидных связей. Глутоксим и GSSG стимулировали EGFR при концентрациях 0.002–0.02 ммоль/л, что соответствует содержанию GSSG в межклеточной жидкости. Активность EGFR появлялась через 5 мин после внесения веществ и была максимальна на 60 мин. Действие препарата глутоксим и GSSG на клетки сопровождалось активацией MAP-киназ – ERK1,2, транскрипционного фактора STAT3, но не STAT1. Активация цитоплазматических белков имела волнообразный

характер, определяясь на 1, 4, 8, 16 и 24 ч инкубации. Результаты исследований указывают на способность препаратов окисленного глутатиона восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов и, соответственно, чувствительность клеток к их воздействию [7], что позволяет объяснить ряд фармакологических эффектов изучаемых средств действием эндогенных цитокинов.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что противолучевой эффект препаратов окисленного глутатиона может быть обусловлен их способностью ускорять репаративные процессы в клетках костного мозга, стимулировать продукцию зрелых клеток крови и восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н., Зацепин В.В., Назаров В.Б., Власенко Т.Н. Современные возможности медикаментозной профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Военно-медицинский журнал. 2011. Т. 332, № 2. С. 13-17.

2. Singh V.K., Newman V.L., Romaine P.L.P., Wise S.Y., Seed T.M. Radiation countermeasures agents: an update (2011 – 2014) // Expert Opin. Ther. Pat. 2014. Vol. 24, № 11. P. 1229-1255.

3. Singh V.K., Hanlon B.K., Santiago P.T., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: Part III. Countermeasures under early stages of development along with ‘standard of care’ medicinal and procedures not requiring regulatory approval for use // Int. J. Rad. Biol. 2017. Vol. 93, № 9. P. 885-906.

4. Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Ладанова Т.В., Бурова Е.Б. Патофизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2013. № 3 (43). С. 32-37.

5. Антушевич А.А., Антушевич А.Е., Гребенюк А.Н., Тарумов Р.А., Антонов В.Г. Экспериментальное изучение лечебной эффективности литиевой соли дисульфида глутатиона в условиях острого внешнего воздействия γ -излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53, № 5. С. 451-458.

6. Ярцева А.А., Антушевич А.Е., Гребенюк А.Н. Экспериментальное изучение механизмов гемостимулирующей активности органической соли дисульфида глутатиона и инозина в условиях острого радиационного воздействия // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2016. № 1. С. 21-25.

7. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // Mol. Aspects Med. 2009. Vol. 30, № 1-2. P. 1-12.

ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ И РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СВЕРХКОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ

*Р.М. Арутюнян^{1,2}, Г.Г. Оганесян¹, Б.А. Григорян³, Г.В. Цаканова^{2,3},
С.Г. Арутюнян¹, Т.А. Арутюнян¹, Н.С. Бабаян^{1,2}*

¹ Ереванский государственный университет, ² Институт молекулярной биологии НАН РА,

³ Институт синхротронных исследований “Кендл”, Ереван, Армения,
e-mail: rouben_a@hotmail.com

Резюме. Были исследованы гено- и цитотоксические эффекты облучения ультракороткими импульсами электронов (УИЭ). Облучение УИЭ приводит к двунитевым разрывам ДНК, активизации ДНК-ПК зависимой репарации, и нестабильности вариаций последовательностей ДНК в клетках человека. Показано, что апоптоз является основным механизмом клеточной гибели при облучении УИЭ. Полученные результаты могут способствовать определению эффективных параметров УИЭ облучения для потенциального применения в клинической практике.

Ключевые слова: облучение, ультракороткие импульсы, ускоренные электроны, повреждения/репарация ДНК, CNV, апоптоз

Assessment of DNA damage and repair after irradiation with ultrashort pulses of accelerated electrons

*R.M. Aroutiounian^{1,2}, G.G. Hovhannisyanyan¹, B.A. Grigoryan³, G.V. Tsakanova^{2,3},
S.G. Harutyunyan¹, T.A. Harutyunyan¹, N.S. Babayan^{1,2}*

¹ Yerevan State University, ² Institute of Molecular Biology NAS RA, ³ “CANDLE” Synchrotron Research Institute, Yerevan, Armenia, e-mail: rouben_a@hotmail.com

Summary. Geno- and cytotoxic effects of ultrashort electron beam (UEB) irradiation was studied. It was shown, that UEB induces DNA double strand breaks (DSBs), activates DNA-PK dependent pathway of DSBs repair, and instability of DNA copy number variants in human cells. It was shown that apoptosis is the main mechanism of cell death induced by UEB pulses. The obtained results may be useful in the development of effective parameters of pulsed UEB radiation for potential clinical application.

Key words: irradiation, ultrashort pulses, accelerated electrons, DNA damage/repair, CNV, apoptosis

В последние годы активно развиваются технологии получения ускоренных лазером электронов, которые отличаются от обычных, квазинепрерывных ускоренных частиц сверхкороткими импульсами в диапазоне от фемто- до пикосекунд. Преимуществом их применения в клинической практике является моноэнергетический спектральный профиль и меньшая степень бокового рассеяния пучка [1]. Создание направленных ультракоротких импульсов высокой мощности дает возможность дозированного локального воздействия на солидные опухоли с минимальным облучением нормальных тканей. Поскольку длительность облучения сверхбыстрыми электронами намного короче продолжительности биологических процессов в облученных клетках, можно ожидать возникновения иных/новых радиационных эффектов, которые могут повлиять на радиобиологическую эффективность излучения. Кроме мгновенной доставки дозы, очевидным преимуществом лазерных ускорителей электронов является их значительно меньший размер и стоимость, по сравнению с обычными установками, используемыми в радиотерапии [2]. Однако для применения

сверхбыстрого электронного излучения в клинической практике необходимо изучение его радиобиологической эффективности в различных тест-системах.

Целью исследования являлось изучение влияния ультракороткого импульсного электронного облучения на повреждение и репарацию ДНК в клетках человека, а также определение путей клеточной гибели.

Материалы и методы: В качестве источника облучения использовали линейный ускоритель с лазерным фотокатодом АРЕАЛ (CANDLE, Армения) [3]. Клетки облучали в дозах 0,1 – 24 Гр при низкой (3,6 Гр/мин, НМД) и высокой (36 Гр/мин, ВМД) мощности дозы. В исследованиях использовали клетки человека (К-562- хроническая миелодная лейкемия, МРС-5- фибробласты, лимфоциты крови человека). Клетки культивировали в стандартных условиях CO₂-инкубатора (5 % CO₂, 37°C) с использованием сред и сывороток, рекомендованных АТСС для культивирования каждого конкретного типа клеток. Уровень повреждений ДНК определяли с помощью метода ДНК-комет. Образование двуниевых разрывов (ДР) ДНК и механизмы репарации ДНК были исследованы с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток с использованием антител, специфичных к фосфорилированному гистону H2АХ, а также к каталитической субъединице ядерной ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК). Вариации числа копий последовательностей ДНК определяли методом флюоресцентной *in situ* гибридизации. Возможные пути клеточной гибели определяли методом окрашивания Annexin V/PI с использованием проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение: Показано дозозависимое повышение уровня повреждений ДНК непосредственно после НМД и ВМД облучения в интервале 1-8 Гр. Через 24 ч после НМД облучения уровень повреждений ДНК статистически не отличался от контроля, что свидетельствует о полной репарации образованных повреждений. Однако, при ВМД облучении наблюдалось снижение количества повреждений ДНК после 24 ч до уровня, существенно превышающего контрольное значение, что свидетельствует об образовании нерепарируемых повреждений.

Было показано дозозависимое повышение количества локусов гамма-H2АХ, свидетельствующее об образовании ДР ДНК. В течение 4 ч после облучения уровень ДР ДНК снизился на 50%, однако после 24 ч уровень ДР оставался выше контрольного уровня, что свидетельствует об образовании нерепарируемых повреждений. ДР ДНК при НМД и ВМД облучении репарировались с участием ДНК-зависимой протеинкиназы, повышение уровня которой имело дозозависимый характер. В течение 4-24 ч наблюдалось снижение уровня ДНК-ПК в соответствии с уровнем гамма-H2АХ.

Была выявлена переменность числа копий последовательностей ДНК в локусах хромосом 1p31.1, 7q11.22, 9q21.3 и 16q23.1 72 ч после облучения. При исследовании пути клеточной гибели наблюдалось статистически достоверное повышение числа апоптотических клеток уже при 0,25 Гр облучения. Было показано, что в течение 24 ч после облучения (1 Гр) 40% клеток погибает по апоптотическому пути.

Выводы: Облучение клеток ультракороткими импульсами электронов приводит к образованию повреждений ДНК и гибели клеток путем апоптоза. Большинство повреждений ДНК, индуцированных НМД облучением, а также часть повреждений индуцированных ВМД облучением, репарируется через 24 часа. Показано участие ДНК-зависимой протеинкиназы при репарации повреждений ДНК. После репарации ДНК наблюдается *de novo* изменение вариаций числа копий последовательностей ДНК.

Список литературы

1. Faure J., Glinec Y., Pukhov A., Kiselev S., Gordienko S., Lefebvre E., Rousseau J.P., Burgy F., Malka V. A laser-plasma accelerator producing monoenergetic electron beams // *Nature*. 2004. Vol. 431. P. 541–544.
2. Gauduel Y. Laser-plasma accelerators based ultrafast radiation biophysics. In: *Laser-driven particle acceleration towards radiobiology and medicine* / Ed. Giulietti A., Springer, 2016. P. 19–50.
3. Tsakanov V.M., Aroutiounian R.M., Amatuni G.A. [et al]. AREAL low energy electron beam applications in life and materials sciences // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2016. Vol. 829, P.248-253.

**НЕРЕАЛИЗОВАННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И НЕРЕШЁННЫЕ
ПРОБЛЕМЫ КОМПЛЕКСОНАТОТЕРАПИИ ПОРАЖЕНИЙ
РАДИОАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

И.К.Беляев, Е.С.Жорова, И.М.Парфенова, Г.С. Тищенко

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

e-mail: 9424159@bk.ru

Резюме. Изложены перспективы реализации медико-биологических аспектов противорадиационной национальной безопасности при воздействии на организм радиоактивных веществ. Акцентируется внимание на необходимости разрешения цинкацина к медицинскому применению в РФ. Подчеркнута целесообразность разработки и внедрения в практику отечественного здравоохранения лекарственных форм пентацина (для индивидуальных ингаляций, перорального, кожного применения) и комплексонатов четвертого «поколения». Отмечена практическая значимость экспериментально-клинической оценки совместимости комплексонатов, фармакопейных радиопротекторов и антидотов в условиях внешнего и внутреннего облучения.

Ключевые слова: радиоактивные вещества, комплексонотерапия, пентацин, цинкацин, гидроксипиридонаты

**UNREALIZED POSSIBILITIES AND UNSOLVED PROBLEMS OF
COMPLEXONAT THERAPY OF DEFEATS WITH RADIOACTIVE SUBSTANCES**

I.K.Belyaev, E.S.Zhorova, I.M.Parfenova, G.S. Tishchenko

Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia.

e-mail: 9424159@bk.ru

Summary. The prospects of implementing the medical and biological aspects of the anti-radiation national security under the impact of radioactive substances on the organism are outlined. Attention is focused on the need to allow zincacin to medical use in the Russian Federation. The expediency of development and introduction in practice of domestic health of medicinal forms of pentacin for individual inhalations, oral, dermal application and fourth generation complexonats. Practically important is the experimental clinical evaluation of the compatibility of complexonats, pharmacopoeial radioprotectors and antidotes in conditions of external and internal irradiation.

Key words: radioactive substances, complexonat therapy, pentacin, zincacin, hydroxypyridonates,

Защита от воздействия радиоактивных веществ достигается путем предотвращения их инкорпорации и ускорения выведения из организма. Ускорение выведения плутония, америция, юрия, иттрия, церия, цинка, кадмия, кобальта, марганца и свинца [1] в клинической практике отечественного здравоохранения осуществляется единственно производимым и разрешенным в России препаратом – пентацином. Водный раствор комплексоната (хелата) – тринатрийкальциевой соли комплексона (хеланта) диэтилентриаминопентауксусной кислоты (Na_3CaDTPA , кальция тринатрия пентетат) предназначен для ингаляций и инъекций. В странах Европейского Союза, США, Китае и Японии к медицинскому

применению разрешён менее токсичный, чем пентацин, цинкацин (Na_3ZnDTPA). Необходимость разрешения цинкацина к медицинскому применению в России очевидна [2]. ГНИИИ военной медицины МО РФ и Федеральным медицинским биофизическим центром им. А.И. Бурназяна ФМБА России акцентируют внимание на целесообразности разработки и комплектно-табельного оснащения войскового звена медицинской службы Вооруженных Сил РФ порошкообразной лекарственной формой пентацина для самостоятельных разовых ингаляций.

Директивы национальной безопасности HSPD-18 и HSPD-21, подписанные президентом США в 2007 г., предусматривают в рамках государственной системы мер по ликвидации последствий массовых радиационных поражений, аварий и терроризма закладку в госрезерв Са- и Zn-DTPA [2].

Номенклатура запасов комплексообразующих агентов, создаваемых для гражданской обороны, предполагает разработку неинъекционных и неингаляционных лекарственных форм.

Резорбция пентацина и цинкацина в водном растворе из желудочно-кишечного тракта составляет менее 5% [2], пентацина через intactные кожные покровы – менее 1% [3]. Поэтому с целью ускорения выведения радионуклидов из организма за рубежом апробированы таблетки Са- и Zn-DTPA, содержащие наноразмерные препараты, которые по эффективности не отличаются от внутривенной лекарственной формы [2]. Исследован транскутанный способ введения пентацина в диметилсульфоксиде [3,4].

Не решена проблема декорпорации радионуклидов из органов вторичного депонирования. Пентацин практически не проникает через клеточные мембраны и обладает низкой эффективностью в выведении ^{239}Pu , депонированного в клетках печени и в матриксе костной ткани. Инкапсулированный в липосомы он способен более эффективно, чем его водный раствор, удалять мономерный ^{239}Pu из цитоплазмы и органелл. Вместе с тем, его комплексообразующая способность недостаточна для связывания в клетках полимерного и коллоидного ^{239}Pu [5, 6]. Остаётся многообещающим принцип применения липосом для транспорта комплексонатов, способных более эффективно, чем пентацин, взаимодействовать с радионуклидами.

Интенсивные исследования эффективности комплексонатов четвертого «поколения» (синтетических аналогов микробных сидерофоров) мультидентатных гидроксипиридонатов 3,4,3-LI(1,2-НОРО) и 5-LIO(Me-3,2,НОРО) осуществляются в лабораториях Калифорнии, Беркли, Ричланда и Портланда (США) [7]. Декорпорирующая $^{238}\text{Pu(IV)}$ цитрат, $^{241}\text{Am(III)}$ цитрат, $^{233}\text{U(VI)O}_2$ и $^{237}\text{Np(V)O}_2$ эффективность лигандов, активных и при пероральном введении, превосходит пентацин. Необходимость разработки и внедрения отечественных аналогов сидерофоров очевидна.

Практически значима экспериментально-клиническая оценка совместимости комплексонатов, противолучевых препаратов и фармакопейных антидотов в условиях сочетанного внешнего γ -облучения и поступления в организм продуктов ядерного деления урана и плутония (в частности, ^{131}I , ^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{106}Ru , ^{144}Ce).

Список литературы

1. Инструкция по применению лекарственного препарата пентацин. Регистрационный номер ЛП 000521, Минздрав России. 27.10.2016, 9 с.// www.atomfarm.ru.
2. Ковтун В.Ю., Гладких В.Д., Давидович Ю.А. и соавт. К вопросу об использовании лекарственных форм пентацина и цинкацина. Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2015, Том 60, № 1, с.45-53.

3. Иванников А.Т., Беляев И.К., Парфенова И.М. Фармакокинетика ^{14}C -пентацина при перкутанном поступлении, Фармакология и токсикология, 1983, № 6, с. 48-51.

4. Иванников А.Т., Беляев И.К., Алтухова Г.А. Влияние способа введения пентацина на выведение из организма крыс ^{239}Pu и ^{241}Am . //Радиобиологический эксперимент и человек. Сборник научных трудов под ред. проф. Ю.И.Москалева, М.,1986, с.74-78.

5. Смирнов А.А., Алтухова Г.А., Беляев И.К. и соавт. Эффективность выведения полимерного ^{239}Pu пентацином, инкапсулированным в липосомах.// Радиобиология, 1984, т.24, N 3, с.386-388.

6. Смирнов А.А., Беляев И.К., Иванников А.Т., Ильин Л.А. Некоторые закономерности выведения мономерного ^{239}Pu из скелета и печени пентацином, инкапсулированным в липосомах.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1985, N 10, с.431-433.

7. Abergel Rebecca J., Durbin Patricia W., Kullgren Birgitta et.al. Biomimetic Actinide Chelators: An Update on the Preclinical Development of the Orally Active Hydroxypyridonate Decorporation Agents 3,4,3-LI(1,2-НОРО) and 5-LIO(Me-3,2-НОРО). //Health Phys. 2010 September; 99(3): 401-407.

МАРКЕРЫ ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДИГИОЗАНА ПРИ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ ОВЕЦ

В.А.Бударков, Н.В. Грехова

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», пос.
Вольгинский Россия,
e-mail: budarkovva@yandex.ru

Резюме. Маркерами ответа на терапию продигиозаном острой лучевой болезни овец, вызванной гамма облучением (¹³⁷Cs) в дозе 4 Гр при мощности дозы 0,8 Гр/ч могут являться: увеличение концентрации кортизола, циклических нуклеотидов и повышение соотношения цАМФ/цГМФ в плазме крови; индукция эндогенного интерферона и повышение уровня аутоантител в сыворотке крови к тканям селезенки и семенников; лейкоцитоз нейтрофильного характера и усиление фагоцитарной емкости крови.

Ключевые слова: овцы, острая лучевая болезнь, продигиозан, маркеры эффективности противолучевого действия

MARKERS OF THE CURATIVE EFFECT OF PRODIGIOSAN AT ACUTE RADIATION SICKNESS OF SHEEP

V.A. Budarkov and N.V. Grekhova

Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center for Virology
and Microbiology (FSBSI FRCVM), Volginsky, Russia,
e-mail: budarkovva@yankdex.ru

Abstract. A number of factors including increase in cortisol & cyclic nucleotide concentrations or raise of cAMP/cGMP ratio in blood plasma; induction of endogenous interferon and increase in autoantibody levels against spleen and/or testis tissues in blood serum, and neutrocytosis & enhanced phagocytic capacity may serve as markers of the response to prodigiosan therapy carried out at acute radiation sickness of sheep induced with gamma-irradiation (¹³⁷Cs) at a dose of 4 Gr and the radiation intensity of 0.8 Gr/hour.

Key words: sheep, acute radiation sickness, prodigiosan, markers of radioprotective effect

Применение средств и методов ранней терапии радиационных поражений позволяет существенно повысить вероятность благоприятного исхода острой лучевой болезни и облегчить ее течение [1]. Одним из препаратов, обладающих выраженным противолучевым действием является бактериальный липополисахарид продигиозан, выделенный из *Bakt. prodigiosum* [2]. Показано, что введение продигиозана лабораторным животным (крысы, мыши, морские свинки) повышало их выживаемость при облучении рентгеновскими лучами. По наиболее распространенным в отечественной радиобиологии классификациям продигиозан относится к группам стимуляторов радиорезистентности или средств, ускоряющих репарацию. Между тем, предварительный анализ показал, что переход к оценке эффективности на крупных лабораторных животных меняет иерархию препаратов в классификации противолучевых средств [3]. Большое значение в уточнении структуры классификации противолучевых средств имеет выбор маркеров их действия.

Цель исследования: выявление маркеров лечебного действия продигиозана при острой лучевой болезни овец.

Материалы и методы. Опыты проведены на 51 овце породы прекос в возрасте от 8 до 24 мес., массой тела от 30 до 60 кг. Животных подвергали общему внешнему

двустороннему облучению γ -квантами ^{137}Cs на γ -установке ГУС-4000 в дозе 4 Гр (СД 80-100/60) при мощности дозы 0,8 Гр/ч, которая вызывает костномозговую форму острой лучевой болезни. В опытах использовали 0,005% раствор продигиозана (производитель «Фармацевтическое объединение», г. Москва), который вводили однократно внутримышечно в дозе 5 мкг/кг массы тела в разные сроки: через 10-20 мин, 3, 24 ч после облучения животных.

Экспериментальное изучение продигиозана в качестве средства терапии радиационного поражения овец проводили в соответствии с Методическими указаниями [4]. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по [5]. О функциональной активности коры надпочечников судили по концентрации в сыворотке крови кортизола, который определяли методом радио иммунологического анализа с помощью набора РИА-КОРТИЗОЛ-СТ (г. Минск); концентрацию циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в плазме крови - с помощью наборов фирмы "Amersham" (Великобритания) по инструкциям, приложенным к наборам. Уровень аутоантител к лизату эритроцитов, клеткам селезенки и семенников изучали по методике Уанье в модификации [6]. Активность интерферона в сыворотке крови оценивали по вирусстатическому действию в культуре клеток [7]. Исследования проводили до начала радиационного воздействия, через 3ч, 1,3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 сут после него. Цифровые данные экспериментов обрабатывали стандартными методами вариационной статистики.

Результаты. Количество лейкоцитов у подопытных животных, подвергнутых воздействию облучения и получивших продигиозан, понижалось в меньшей степени, чем у только облученных контрольных овец. С 15-х по 60-е сут в подопытной группе число нейтрофилов было существенно выше, чем в контрольной ($p \leq 0,05$). Показатели фагоцитарной емкости нейтрофилов подопытных овец по сравнению с контролем были достоверно выше на 15-60 сут от начала облучения ($p \leq 0,05$).

Концентрация кортизола в плазме крови всех облученных овец в первую декаду существенно, по отношению к исходному уровню, увеличивалась. Ее максимум наблюдали через 3 часа после облучения, в подопытной группе это увеличение было выражено сильнее, чем в контроле ($p \leq 0,05$).

После облучения в разгар лучевой болезни у овец обеих групп в сыворотке крови повышался уровень антител к различным органам и тканям. У леченых животных на большинстве сроков наблюдения содержание аутоантител было больше, чем у только облученных, со статистически значимым различием к лизату эритроцитов на 30-е сут, к тканям селезенки и семенников, соответственно, на 10- и 30-е сутки.

Введение продигиозана индуцировало образование интерферона в сыворотке крови через 1 - 20 сут после облучения овец. По этому показателю между подопытной и контрольной группами в эти же сроки регистрировали статистически значимые различия ($p \leq 0,05$).

Уровень цАМФ в плазме крови к 5-м сут у леченных продигиозаном облученных животных был достоверно выше, а у нелеченных - существенно ниже исходной концентрации ($p \leq 0,01$). Достоверные различия между подопытной и контрольной группами отмечено на 5- и 15-е сут. При исследовании концентрации цГМФ значительный подъем его уровня наблюдали как в контрольной, так и в подопытной группе овец через 3 ч после облучения. В подопытной группе этот пик существенно превосходил уровень цГМФ в контрольной группе. При анализе соотношения циклических нуклеотидов статистически значимое межгрупповое различие в виде повышенного уровня цАМФ по сравнению с цГМФ выявлено на 3-, 5- и 10-е сут после облучения.

Обсуждение. В ходе проведенных работ установлено, что однократное внутримышечное введение продигозана в дозе 5 мкг/кг через 10-20 мин, или через 3 и 24 ч после облучения снижало степень тяжести клинических проявлений лучевой болезни и повышало выживаемость животных. В течение 60 дней после облучения и лечения через 10-20 мин выжило 14 из 14 овец при выживаемости в контроле 5 из 15 животных. После введения продигозана спустя 3 или 24 ч от момента облучения выжили соответственно 3 из 6 и 8 из 10, в контроле - 2 из 6 овец. В целом, о лечебной эффективности препарата свидетельствует повышение выживаемости в 2,5 раза. Различие между опытом и контролем, оцененное по точному методу Фишера, являлось достоверным при $p \leq 0,01$.

Гуморальными индикаторами противолучевых эффектов, сопряженных со стадией развития лучевого поражения овец могут быть: увеличение концентрации кортизола, циклических нуклеотидов и повышение соотношения цАМФ:цГМФ в плазме крови с 3-го часа; индукция эндогенного интерферона в с 1-х по 20-е сут и повышение уровня аутоантител в сыворотке крови к тканям селезенки и семенников с 10-х сут. К числу клеточных маркеров лечебного действия продигозана при острой лучевой болезни овец можно отнести лейкоцитоз нейтрофильного характера и усиление поглотительной функции нейтрофилов/фагоцитарной емкости крови в период с 1-5 по 60-е сутки от момента облучения, характеризующих повышение устойчивости организма к инфекции.

Следовательно, противолучевой эффект продигозана состоял в активизации процессов врожденного неспецифического иммунитета, включающего в качестве обязательного компонента усиленную мобилизацию клеток гранулоцитарного ряда. Продигозан вполне вписывается в структуру новейшей бинарной классификации противолучевых средств [3] как препарат группы экзогенных иммуномодуляторов с Толл-подобной рецепцией сигнала через рецепторы цитокинов.

Работа выполнена при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации по соглашению №14.601.21.0016, уникальный идентификатор соглашения: RFMEFI60117X0016.

Список литературы

- 1.Чертков КС. Средства ранней терапии острой лучевой болезни. Радиационная медицина. Т. I. Теоретические основы радиационной медицины / Под ред. акад. РАМН Л.А. Ильина. М.: Изд. АТ, 2004.- С. 728-739.
2. Ермольева З.В., Вайсберг Г.Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды.- М.: Медицина, 1976 – 183 с.
3. Рождественский Л. М. Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения //Радиац. биология. Радиоэкология.- 2017.- Т. 57.- №2.- С.117-135
4. Методические указания по экспериментальному и клиническому изучению средств терапии радиационных поражений и медико-биологические требования к этим средствам.- М., 1978.- 48 с.
5. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1975.- 360 с.
6. Клемпарская Н.Н., Раева Н.В. Исследование аутосенсбилизации при лучевой болезни методом Уанье// Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1961.- Т.58, №5.- С.77-81.
7. Садыков А.С., Ершов Ф.И., Новохатский А.С. и др. Индукторы нтерферона.- Ташкент: ФАН. – 1975.- 305 с.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ БИОПРЕПАРАТОВ И ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И РЕПАРАЦИИ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Ю.М. Васильев

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт Петербург, Российская Федерация

e-mail: vasiliev@hpb-spb.com

Резюме. Биопрепараты и, в частности, иммунофармакологические средства могут быть использованы для поддержания и коррекции нарушений гомеостаза при воздействии экстремальных факторов, включая радиационные воздействия; а один из наиболее перспективных подходов поиска средств химической защиты и репарации при радиационных воздействиях - скрининг уже имеющихся или разрабатываемых препаратов, а также их комбинаций.

Ключевые слова: биопрепараты, иммунофармакология, радиационное воздействие, экстремальные факторы, космические полеты

DEVELOPMENT OF BIOLOGICALS AND IMMUNOPHARMACOLOGY PREPARATIONS FOR CHEMICAL PROTECTION AND REPARATION DURING RADIATION EXPOSURE

Y.M. Vasiliev

Federal State Unitary Enterprise “State Research Institute of Ultrapure Biologicals” of the Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

e-mail: vasiliev@hpb-spb.com

Abstract. Biologicals and especially immunopharmacology preparations could be used to support and correct homeostasis alterations during extreme factor exposure, including radiation; and one of the most perspective approaches for discovery of means of chemical protection and reparation during radiation exposure is screening of the already available preparations or those under development, as well as their combinations.

Key words: biologicals, immunopharmacology, radiation exposure, extreme factors, space flights

В современных реалиях, в частности- внедрение технологий с использованием радионуклидов в различных отраслях народного хозяйства, а также интенсификация освоения космоса - проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях становятся все более актуальными.

Необходимо отметить, что распространение заболеваний онкологической природы обуславливает расширение применения лучевой терапии и, как следствие, необходимость лечения, а также профилактики соответствующих побочных эффектов.

Для решения вышеобозначенных задач - создания современных эффективных, безопасных и экономически целесообразных при массовом применении препаратов - необходимы принципиально новые направления поиска, исследований и разработки.

Одним из ключевых патогенетических факторов поражений при воздействии экстремальных факторов физической природы, в том числе при радиационных воздействиях, является генерация свободных радикалов. В связи с этим препараты антиоксидантов давно привлекают внимание ученых как средства для экстренной профилактики и лечения радиационных воздействий, в том числе при лучевой и химиолучевой терапии. Весьма перспективным препаратом этой группы является супероксиддисмутаза (СОД), потенциал применения которого включает терапию (регенерацию) после воздействия различных экстремальных факторов физической природы, в том числе радиационного воздействия.

Цитокины и ростовые факторы (например, стимуляторы эритропоэза) также перспективны как потенциальные средства для усиления регенерации после радиационных воздействий; при этом особый интерес представляет расширенный скрининг по уже имеющимся и разрабатываемым препаратам. Так, в отношении адьюванта для вакцин флагеллина (агонист TLR5) была показана не только активность в составе иммунопрофилактических средств, но и прямое действие в отношении микроорганизмов различной природы, а также ряда химических средств и радиации.

Кроме того, целесообразно изучение комбинированных (комплексных) иммунобиопрепаратов, в том числе антагонистов (рекомбинантные биоактивные молекулы, гуманизированные моноклональные антитела) для стимулирования и коррекции иммунного статуса; например, модуляции гипервоспаления («цитокинового шторма»), патогенетически сопровождающего воздействие ряда экстремальных факторов физической, химической и биологической природы.

Представляет интерес и изучение положительного эффекта неспецифических средств как адаптогены, нейро- и стресс-протекторы различного происхождения (например, синтетические пептиды, повторяющие биологическую активность природных аналогов). В части пробиотических комплексов принципиально важно показать биологическую активность в условиях реального космического полета (микрогравитация, фоновая радиация). Эти препараты весьма актуально изучать в составе комплексных средств для профилактики, в том числе экстренной, терапии последствий радиационного воздействия и реабилитации после таких экстремальных ситуаций.

Следует отметить и возможности усиления (потенцирования) профилактического и терапевтического эффекта за счет выбора оптимального способа введения: с одной стороны простого в применении (мази, аэрозоли), а с другой стороны - обеспечивающего замедленное высвобождение и пролонгированное действие (например, системы доставки на основе микро-/наночастиц). В части обеспечения направленного и пролонгированного воздействия биоактивными белками интерес представляют ДНК-препараты и соответствующие системы введения (например, электропорация).

Таким образом, биопрепараты и, в частности, иммунофармакологические средства различных групп могут быть использованы для поддержания и коррекции нарушений гомеостаза при воздействии экстремальных факторов, включая радиационные воздействия; а один из наиболее перспективных подходов поиска средств химической защиты и репарации при радиационных воздействиях - скрининг уже имеющихся или разрабатываемых препаратов, а также их комбинаций, в том числе с неспецифическими средствами.

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА,
КОДИРУЮЩЕГО КРОВЕТВОРНЫЕ РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ SCF, G-CSF и
FLT-3L, НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЙ**

О.А. Власова^{1,2*}, *И.В. Багнаев*¹, *Е.А. Афонькина*¹, *А.С. Никифоров*², *И.С. Кравцов*¹

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал»,
Москва, Россия

² Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: chuvashenok@yandex.ru

Резюме. Получены три рекомбинантные плазмидные ДНК (пДНК), кодирующие кроветворные ростовые факторы SCF, G-CSF и FLT-3L. В экспериментах *in vitro* показана экспрессия этих ростовых факторов на уровне $5,2 \pm 0,1$ мкг, $2,2 \pm 0,2$ мкг, и $8,2 \pm 0,7$ мкг, с эффективностью секреции - 75,6%, 99,1% и 88,7%, соответственно. Физиологическую активность оценивали в экспериментах на белых аутбредных мышцах-самцах при однократном внутримышечном введении смеси трех пДНК в сочетании с электропорацией. Было показано статистически достоверное увеличение общего количества лейкоцитов, в том числе гранулоцитов и моноцитов, с максимумом на 7 сутки ($22,2 \pm 2,2$ против $8,5 \pm 0,9$ млрд/л, $16,5 \pm 11,1$ против $3,6 \pm 0,9$ млрд/л и $2,3 \pm 1,1$ против $0,8 \pm 0,08$ млрд/л в группе плацебо, соответственно). Полученные результаты подтверждают возможность воздействия разработанных пДНК на систему кроветворения за счет сочетанной экспрессии генов трех ростовых факторов: SCF, G-CSF и Flt-3L.

Ключевые слова: фактор стволовых клеток, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, лиганд Fms-подобной тирозинкиназы-3, радиозащитная эффективность, рекомбинантная плазмидная ДНК, лейкоциты.

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF THE GENE THERAPEUTIC
PREPARATION CODING THE HEMATOPOIETIC GROWTH FACTORS SCF, G-
CSF AND FLT-3L ON THE HEMATOLOGICAL STATUS OF MICE**

O.A. Vlasova^{1,2*}, *I.V. Bagnaev*¹, *E.A. Afonkina*¹, *A.S. Nikiforov*², *I.S. Kravtsov*¹

¹ Federal State Unitary Enterprise «Scientific Center «Signal», Moscow, Russia

² State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense
of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

* e-mail: chuvashenok@yandex.ru

Abstract. We have obtained three recombinant plasmids coding hematopoietic factors SCF, G-CSF, and FLT-3L. Expression of these factors *in vitro* was equal to 5.2 ± 0.1 μ g, 2.2 ± 0.2 μ g, and 8.2 ± 0.7 μ g with secretion efficiencies of 75.6%, 99.1%, and 88.7% respectively. We assessed physiological activity on white outbred mice males after single intramuscular injection of three plasmids combined with electroporation. We discovered statistically significant increase of white blood cells, including granulocytes and monocytes compared to placebo with a maximum after one week after injection (22.2 ± 2.2 against 8.5 ± 0.9 billion cells/L, 16.5 ± 11.1 against 3.6 ± 0.9 billion cells/L and 2.3 ± 1.1 against 0.8 ± 0.08 billion cells/L respectively). Our results show the possibility of the effect of obtained pDNA on hematopoiesis by combination of three growth factors: SCF, G-CSF, and Flt-3L.

Key words: stem cell factor, granulocyte colony-stimulating factor, ligand of Fms-like tyrosine kinase-3, radioprotective efficiency, recombinant plasmid DNA, leukocytes.

Поиск оптимальных средств, эффективных при терапии радиационных поражений, а также для сопровождения химиолучевой терапии все еще остается одной из важных проблем радиационной биологии и медицины. Терапевтические мероприятия, начатые в ранние сроки после облучения, могут обеспечить благоприятный исход радиационного поражения [1]. Известно, что наиболее интенсивно в качестве средств ранней терапии радиационных поражений изучаются цитокины, посредством которых работа различных клеток гемопоэтической системы становится скоординированной и регулируемой [2-4].

Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих гены клинически значимых цитокинов, обладающих взаимно усиливающим действием – фактора стволовых клеток (SCF), гранулоцитарного колонийстимулирующего фактора (G-CSF) и лиганда Fms-подобной тирозинкиназы-3 (Flt-3L), оценка их экспрессионных свойств *in vitro* и *in vivo*, а также подтверждение физиологической активности разработанных пДНК по отношению к показателям периферической крови здоровых животных *in vivo*.

С помощью ПЦР на матрице кДНК соответствующих библиотек тканей мыши (Clontech, США) были получены генетические эквиваленты мышинных SCF, G-CSF и Flt-3L, которые рестрикционным методом клонировали в экспрессионный вектор pC1neo (Promega, США) с получением, соответственно, плазмид pC1neo-mSCF, pC1neo-mGCSF и pC1neo-mFlt3L. Проверку чистоты и размеров пДНК проводили в агарозном геле методом электрофореза с последующей оценкой результатов на УФ-трансиллюминаторе с использованием маркеров молекулярного веса (Fermentas, Латвия). Правильность нуклеотидной последовательности клонированных генов проверяли методом секвенирования по Сэнгеру на автоматическом анализаторе AB 3500 («Applied Biosystems», США), с использованием BrightDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США) и последующей очисткой продуктов сиквенсовой ПЦР с помощью набора DyeEx Spin Kit (Qiagen, Германия).

Оценку экспрессионных свойств полученных генетических конструкций *in vitro* проводили путем трансфекции клеток HEK293T/17 с использованием линейного полиэтиленimina 25 кДа (L-PEI25) (Alfa Aesar, США) согласно протоколу производителя, при массовом соотношения пДНК и L-PEI25 1:3. Определение количественного содержания белков SCF, G-CSF и Flt-3L в образцах культуральной среды и лизатов клеток проводили методом ELISA согласно протоколам производителей соответствующих коммерческих наборов (Sigma-Aldrich, США), через три дня после трансфекции. Была показана эффективная экспрессия соответствующих ростовых факторов на уровне $5,2 \pm 0,1$ мкг, $2,2 \pm 0,2$ мкг, и $8,2 \pm 0,7$ мкг для SCF, G-CSF и Flt-3L, соответственно. При этом эффективность секреции составила 75,6%, 99,1% и 88,7%.

Для подтверждения физиологической активности разработанных генетических конструкций использовали белых аутбредных мышей-самцов массой 20-22 г. Так как ранее нами было установлено, что введение пДНК, кодирующих гены SCF, G-CSF или Flt-3L, по отдельности не приводит к достоверным изменениям показателей крови, животным вводили однократно внутримышечно смесь трех пДНК в дозе 2,5 мг/кг каждой в комплексе с 0,05% раствором плуроника PE6400. Дополнительно место введения подвергали электропорации (150 В/см, 20 мс, 8 имп, 1 Гц, ВТХ ЕСМ830). Животным контрольной группы аналогичным образом вводили плацебо в виде плазмиды pC1neo, лишенной вставки терапевтического гена. В рамках эксперимента *in vivo* оценивали показатели гемограммы животных и динамику изменения концентрации ростовых факторов в крови. Концентрацию SCF, G-CSF и Flt-3L в сыворотке крови определяли методом ELISA через 6, 17 и 24 часа, а также 3, 5, 7, 9, 14 и 21 сутки после

введения препаратов. Статистически достоверное увеличение концентрации G-CSF в крови наблюдали через 6 часов после введения. В этой временной точке наблюдали 7-ми кратный прирост концентрации G-CSF по отношению к показателям группы плацебо ($1035,0 \pm 298,8$ пг/мл и $323,2 \pm 31,6$ пг/мл, соответственно). Максимум концентрации G-CSF отмечали через 17 часов после введения ($4467,0 \pm 531,8$ пг/мл по сравнению с $291,8 \pm 42,7$ пг/мл в плацебо группе). Статистически достоверные отличия сохранялись до 14-х суток включительно. К 21-м суткам отмечали снижение концентрации до показателей группы плацебо ($513,9 \pm 71,1$ пг/мл против $299,4 \pm 23,3$ пг/мл, соответственно). Для SCF и Flt-3L достоверное увеличение концентрации отмечали на 3-и сутки после введения препарата ($537,5 \pm 56,3$ пг/мл против $205,8 \pm 21,2$ пг/мл и $24,84 \pm 2,6$ нг/мл против $6,72 \pm 1,5$ нг/мл, соответственно). Статистически достоверные отличия сохранялись до 9-х суток включительно.

Основные показатели периферической крови оценивали при помощи автоматического гематологического анализатора Exigo (Boule Medical A.B., Швеция). Однократное введение смеси пДНК мышам обеспечило статистически достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в периферической крови в период с 3-х по 14-е сутки, в том числе гранулоцитов – с 3-х по 14-е сутки, и моноцитов – с 3-х по 7-е сутки, с максимумом на 7 сутки ($22,2 \pm 2,2$ против $8,5 \pm 0,9$ млрд/л, $16,5 \pm 11,1$ против $3,6 \pm 0,9$ млрд/л и $2,3 \pm 1,1$ против $0,8 \pm 0,08$ млрд/л в группе плацебо, соответственно).

Полученные результаты подтверждают возможность стимулирующего воздействия разработанных пДНК на систему кроветворения за счет сочетанной экспрессии генов трех ростовых факторов: SCF, G-CSF и Flt-3L. Раннее проявление физиологических эффектов, очевидно, связано с быстрым стартом экспрессии целевых генов (достоверный прирост концентрации G-CSF в крови наблюдали к 6 часу, а SCF и Flt-3L – к 3-м суткам), что в целом характерно для невирусных векторов при внутримышечном введении. Сохранение экспрессии соответствующих генов на протяжении полутора-двух недель после однократного введения смеси пДНК, позволяет поддерживать стимуляцию гемопоэтической системы на протяжении относительно длительного времени. Следует подчеркнуть, что все наблюдаемые эффекты являются результатом однократного введения плазмидного препарата, что удобнее многодневных курсов инъекций соответствующих рекомбинантных белков.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности стимуляции кроветворения с использованием разработанных пДНК и необходимости дальнейших исследований в направлении оценки их терапевтического действия на моделях лучевого поражения.

Список литературы

1. Ильин Л.А. Радиационная медицина: в 4 т. Теоретические основы радиационной медицины / Л.А. Ильин. – М.: Изд. АТ. – 2004. – Т. 1. – 992 с.
2. Власенко Т.Н. Современные подходы к фармакологической профилактике радиационных поражений / Т.Н. Власенко, В.Б. Назаров, А.Н. Гребенюк // Биомедицинский журнал «Medline.Ru». – 2010. – Т. 11. – С. 230-253.
3. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант. – 2008. – 550 с.
4. Johnke R.M., Radioprotective agents for radiation therapy: future trends / R.M. Johnke, J.A. Sattler, R.R. Allison // Future Oncol. – 2014. – Vol. 10, № 15. – P. 2345-2357.

РАДИОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 532 НМ НА КЛЕТКИ ФИБРОБЛАСТОВ

К.Ш. Восканян, А.В.Рзянина, Г.В.Мицын, В.Н. Гаевский

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия,

e-mail: voskan@jinr.ru

Резюме. Проводились исследования с целью проверки предположения о том, что при радиозащитном действии малых доз лазерного излучения с длиной волны 633 нм первичными фоторецепторами являются клеточные цитохром-с-оксидазы. Для этого было создано устройство для радиационной защиты биологических объектов на основе лазерного модуля с длиной волны 532 нм. Эксперименты, проведенные на клетках фибробластов мышей, показали, что радиозащитный эффект наблюдается в дозовом интервале лазерного облучения от 0,4 до 0,85 мДж/см², с максимальной эффективностью при плотности энергии лазерного облучения ~ 0,56 мДж/см². Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что при радиозащитном действии малых доз лазерного излучения с длиной волны 633 нм, так же как и 532 нм первичными фоторецепторами являются цитохром- с-оксидазы.

Ключевые слова: гамма-излучение, лазерное излучение, радиозащитный эффект.

RADIOPROTECTIVE EFFECT OF LASER RADIATION WITH A WAVELENGTH OF 532 NM ON FIBROBLAST CELLS

K. Sh. Voskanyan, A.V. Rzyanina, G.V.Mitsyn, V. N. Gaevsky.

Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia,

e-mail: voskan@jinr.ru

Summary. Studies have been carried out to test the assumption that the photoreceptors for the radioprotective action of small doses of 633 nm laser radiation are the cytochrome- c- oxidases. To do this, was created the device for radiation protection of biological objects based on laser module with a wavelength of 532 nm. Experiments conducted on mice fibroblasts cells showed that the radioprotective effect is observed in the dosing interval of laser irradiation from about 0.4 to 0.85 MJ/cm². Maximum radioprotecting effect is observed at laser radiation energy density approximately 0.56 MJ/cm². The results suggest that in the case of radioprotective action of small doses of laser radiation with a wavelength of 633 nm, as well as 532 nm primary photoreceptors are the cytochrome- c -oxidase.

Key words: gamma-radiation, laser radiation, radioprotective effect.

Ранее нами было показано, что как предварительное и последующее, так и одновременное с лазерным излучением (с длиной волны 633 нм) облучение фибробластов мышей приводит к увеличению выживаемости клеток, подвергшихся воздействию γ - излучения или протонов. Максимальный радиозащитный эффект наблюдался при плотности энергии лазерного облучения ~1 мДж/см² [1].

Были получены также результаты показывающие возможность передачи радиозащитного воздействия лазерного излучения по механизму “bystander” эффекта [2].

Для выяснения механизма радиозащитного действия лазерного излучения, представляет большой интерес проверка предположения о том, что при радиозащитном действии малых доз лазерного излучения с длиной волны 633 нм

первичными фоторецептором является цитохром-с-оксидаза - компонент дыхательной цепи, локализованной в клеточных митохондриях [3].

С этой целью нами было создано устройство на основе лазерного модуля с длиной волны 532 нм, поскольку эта длина волны также попадает в спектр поглощения цитохром-с-оксидазы.

В экспериментах использовались клетки мышинных фибробластов СЗН10Т1/2 прошедшие не более 18 пассажей из коллекции Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки СЗН10Т1/2 были получены С. Reznikoff с соавторами [4].

Клетки выращивали в среде Игла с солями Эрла, с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки (10 %), пенициллина (50 единиц/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл).

Для синхронизации культуры, фибробласты плотностью $2,7 \cdot 10^3$ клеток/см² высевали в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² и выращивали в течение 11 суток в термостате при температуре 37 °С. Среду обновляли через 6 суток после посева. Такая 11 - суточная культура содержит 94 % клеток в фазе G₁[5].

Для определения выживаемости в пять флаконов высевали такое количество клеток, чтобы в результате можно было получить примерно 100-200 клеточных колоний на флакон. После 10 - суточной инкубации при 37 °С колонии фиксировали метанолом и окрашивали красителем Гимза. Колонии, содержащие более 50 клеток, считали выжившими. Выживаемость определяли сравнением количества колоний, выросших в облученных и необлученных (контрольных) образцах. Эффективность посева для контрольных клеток составляла около 10 %.

Облучение клеток проводилось в Медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований, предназначенном для проведения терапии онкологических заболеваний.

Для облучения клеток - лучами использовали гамма-терапевтический аппарат "Рокус - М" фирмы "Равенство" с источником ⁶⁰Со, мощность дозы ~ 0,67 Гр/мин. Поглощенную дозу измеряли с помощью клинического дозиметра CD 27012 (Германия). Ошибка в определении поглощенной дозы не превышала 5 %.

Для облучения клеток лазерным излучением использовали созданное нами лазерное устройство на основе лазерного модуля с длиной волны 532 нм, который работает в непрерывном режиме. Мощность лазера, измеренная с помощью устройства LFSER POWER METER LP1 (SANVA ELECTRONIC INSTRUMENT CO LTD, JAPAN) была равна 0,3 мВт, размер облучаемой поверхности монослоя клеток - 5,3 см².

При проведении экспериментов по определению дозового интервала, а также значения плотности энергии лазерного облучения, оказывающего максимально эффективный радиозащитный эффект, использовали клеточную суспензию в питательной среде. Клетки сначала подвергались воздействию γ - лучей, затем в течение 20 минут воздействию лазерного излучения.

В экспериментах с использованием прибора «Cell counter» СТ20 (Bio-Rad Laboratories, США) облучению подвергали монослой клеток фибробластов, выращенный на поверхности стенки пластикового флакона. Через час после облучения γ - лучами, монослой клеток облучали максимально эффективной дозой лазерного излучения 0,56 мДж/см² при этом, облучали не всю поверхность стенки флакона, а только ее центральную часть с площадью 5,3 см², поскольку ранее нами было уже показано, что радиозащитное действие лазерного излучения передается по механизму "bystander" эффекта [2]. Через четыре часа после облучения γ - лучами клетки, находящиеся на поверхности как контрольных, так и

всех облученных флаконов суспензировали в 0,25 % растворе трипсина. Затем, суспензию центрифугировали, сливали трипсин и добавляли питательную среду. После этого, клеточную суспензию и краситель трипановый синий смешивали в равных объемах и заполняли слайды для определения выживаемости клеток с помощью автоматического счетчика СТ20.

В результате проведенных экспериментов было установлено что радиозащитное воздействие лазерного излучения наблюдается в дозовом интервале плотности энергии облучения от 0,4 до 0,85 мДж/см², с максимальной эффективностью при плотности энергии лазерного облучения ~ 0,56 мДж/см².

Определение выживаемости клеток с помощью автоматического счетчика СТ20 после воздействия ионизирующего и комбинированных облучений показали, что радиозащитное действие лазерного излучения с длиной волны 533 нм так же, как и излучения с длиной волны 633 нм передается по механизму “bystander” эффекта. Кроме этого, выяснилось, что радиозащитный эффект лазерного облучения наблюдается по критерию количества выживших одиночных клеток, по сравнению с клетками, подвергшимися облучению γ – лучами.

Анализ кривых выживания клеток фибробластов, облученных γ - лучами, а также комбинированно облученных γ - лучами и лазером (0,56 мДж/см²) показал, что лазерное облучение оказывает эффективное радиозащитное действие по критерию выросших клеточных колоний. При этом значение фактора изменения дозы (ФИД), рассчитанное по ЛД₅₀ равно 1,4.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что при радиозащитном действии малых доз лазерного излучения с длинами волн 633 нм и 532 нм первичным фоторецептором является цитохром-с-оксидаза, присутствующая во внутренней мембране всех эукариот, а также в клеточной мембране многих аэробных бактерий.

Список литературы

1. Восканян К. Ш., Мицын, Г.В., Гаевский В.Н. Способ защиты в эксперименте от повреждающего действия ионизирующего излучения // Патент на изобретение RU 2 330 695 С2.

2. Восканян К.Ш., Мицын Г.В., Гаевский В.Н. Некоторые особенности комбинированного действия гамма лучей и лазерного излучения на выживаемость мышинных фибробластов in vitro // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2009. Т. 43. № 2. С. 32-36.

3. Кару Т.Й. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы // Современные лазерно-информационные и лазерные технологии. Сборник трудов ИПЛИТ РАН под редакцией член-корреспондента РАН В.Я. Панченко и профессора В.С. Голубева. Интерконтат Наука 2005. - Москва: Интерконтат Наука. 2005. 304с. С.131-143.

4. Reznikoff C., Bertram J., Brankov D.W., and. Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to post – confluence inhibition of cell division // Cancer Res. 1973. № 33. P. 3231-3238.

5. Terasima T., Yakusava M. and Kimura M. Neoplastic Transformation of plateau-phase mouse 10T1/2 cells following single and fractionated doses of X-rays // Cancer Res.1985. № 102. P. 367-377.

6. Восканян К.Ш., Мицын Г.В.,Гаевский В.Н. Устройство для радиационной защиты биологических объектов в эксперименте (патент на изобретение RU 2 428 228 С2).

**ИННОВАЦИОННЫЕ ПИЩЕВЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ
ОБЫКНОВЕННОЙ, ОБОГАЩЕННЫЕ ПРИРОДНЫМИ
АНТИОКСИДАНТАМИ, «ГРИБНОЙ ЧУДОДЕЙ®» И «ТАЙНА ВЕШЕНКИ®»
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ
РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ γ -ОБЛУЧЕНИЯ**

В.П.Герасименя¹, С.В.Захаров¹, А.В.Трезцова¹, Т.И.Милевич²,

¹ООО «Инбиофарм», Москва, Россия, ²ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»,
Гомель, Беларусь, e-mail: gerasimenia_v_p@mail.ru

Резюме. Учеными России и Беларуси разработаны и проведены медико-биологические исследования и доклинические испытания препаратов, полученных из мицелия *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm (штамм 1137, ВКПМ F 819), содержащих хитин-глюкановый комплекс (ХГК) в комбинации с минеральными веществами, витаминами, аминокислотами, антиоксидантами и др. биологически активными веществами. Изучены радиозащитные свойства исследуемых форм разработанных препаратов. Установлена эффективность их применения в условиях острого и пролонгированного гамма-облучения. Приводятся сведения о регистрации в России двух новых форм пищевых концентратов, которые производятся под марками «Грибной чудодей®» и «Тайна вешенки®». Даются рекомендации по их применению в качестве лечебно-профилактических средств для защиты организма от неблагоприятного воздействия окружающей среды в условиях пострadiационного загрязнения местности.

Ключевые слова: радиоактивное загрязнение, пищевые концентраты, мицелий вешенки, базидиальные грибы, антиоксидант, облучение, детоксикация, сорбция.

**INNOVATION FOOD CONCENTRATES OF THE OYSTER MUSHROOM
MYCELIUM ENRICHED WITH NATURAL ANTIOXIDANTS GRIBNOI
CHUDODEI® AND TAINA VESHENKI® FOR CORRECTION OF THE
POSTRADIATION DISORDERS CAUSED BY DIFFERENT
 γ -IRRADIATION DOSES**

V.P.Gerasimenia¹, S.V.Zakharov¹, A.V.Trezvova¹, T.I.Milevich²

¹Inbiopharm LLC, Moscow, Russia, ²GNU "Institute of Radiobiology Belarus National
Academy of Sciences", Gomel, Belarus, e-mail: gerasimenia_v_p@mail.ru

Abstract: Russian and Belarus specialists established and provided medical and biological investigations also as preclinical tests of drugs, produced from mycelium *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm (strain 1137, VKPM F 819), including chitin-glucan complex combined with minerals, vitamins, amino acids, antioxidants and other dietary supplement substances. Radioprotective properties of these drug forms were studied. Their efficiency was proved in conditions of acute and prolonged gamma irradiation. It is mentioned about the registration in Russia of 2 new forms of food concentrates under trademarks Gribnoi Chudodei® and Taina Veshenki®. The recommendations are made how to apply them as medical and preventive means for purpose to protect the living organism from unfavorable environment in conditions with postradiation contamination.

Key words: Radioactive contamination, food concentrates, Oyster mushroom mycelium, basidiomycetes mushrooms, antioxidants, irradiation, detoxification, sorption.

Актуальность. Радиоактивное загрязнение обширных территорий разных стран после техногенных аварий на АЭС приводит в дальнейшем к продолжительному поступлению в организм человека радионуклидов, в первую очередь цезия и стронция, в регионах повышенного радиоактивного загрязнения. Вместе с тем, проводимые

противорадиационные мероприятия в этих регионах с применением существующих средств недостаточно полно обеспечивают надежные гарантии снижения уровней загрязнения до допустимых контрольно-нормативных значений [1].

Материалы и методы. Опыт проведенных исследований в области совершенствования и создания новых способов и средств противолучевой защиты организма человека показывает, что для решения сложившейся проблемы среди наиболее перспективных сорбционно-активных материалов особое место занимают биологически активные вещества природного происхождения наиболее отвечающие требованиям, предъявляемым к сорбентам, к которым, прежде всего, относятся препараты на основе базидиальных медицинских грибов, полученные из мицелия гриба вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) (Fr.) Kumm [1].

Начиная с 1997 года, учеными ООО «Инбиофарм» (г.Москва) во главе с Заслуженным деятелем науки РФ, доктором технических наук, профессором Герасименей В.П. в результате сотрудничества с Институтом радиобиологии НАН Беларуси удалось разработать и оценить медико-биологическую эффективность препаратов, полученных из мицелия *Pleurotus ostreatus*(Fr.) Kumm (штамм 1137, ВКПМ F 819), выращенного в асептических условиях искусственного культивирования с использованием разработанной и впервые промышленно освоенной в России принципиально новой биотехнологии глубинного культивирования мицелия [2].

Результаты. Установлено, что целебные свойства полученного мицелия связаны с содержащимися в нем глюканами и полисахаридами, в том числе хитином, которые образуют так называемый хитин-глюкановый комплекс (ХГК). Особый интерес вызывает наличие в мицелии пищевых волокон. Эти волокна сорбируют в желудочно-кишечном тракте канцерогенные вещества, ионы тяжелых и радиоактивных металлов и активируют деятельность желудка.

Преимущество получаемого из мицелия ХГК состоит в том, что: во-первых, ХГК грибов обладает более высокой сорбционной емкостью в отношении ионов тяжелых и радиоактивных металлов. При этом сорбционные свойства хитина значительно увеличиваются в комплексе с глюканами, в частности, с присутствующими только у грибов сильно разветвленными β -(1-3)-глюканами с (1-6)-боковыми цепями;

во-вторых, глюканы грибов влияют на супрессивную активность Т-хелперов, восстанавливая гуморальную иммунную систему, тем самым способствуя торможению развития раковых опухолей;

Особо важным компонентом ХГК являются бета-глюканы, играющие роль иммуномодулирующих агентов. Среди минеральных веществ, содержащихся в мицелии вешенки наибольшую ценность представляют железо, фосфор, калий, незаменимый для нормальной работы иммунной системы цинк. Богат мицелий вешенки витаминами В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), Витамин D₂ (эргокальциферол) и др. В мицелии вешенки присутствуют основные незаменимые аминокислоты, такие как лизин, треонин, валин, фенилаланин и др.

Обсуждение. В результате проведенных многолетних исследований и испытаний разработанных составов на основе измельченного мицелия *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm (штамм 1137, ВКПМ F 819) в ООО «Инбиофарм» были разработаны и зарегистрированы в Российской Федерации 2 новые формы пищевых концентратов, которые в настоящее время производятся ООО «Витапром», г. Москва, под товарными марками «Грибной чудодей[®]» (ТУ 9190-036-87552538-15, ДС: ТС N RU Д-RU.АБ52.В.02874 от 08.11.2016 до 07.11.2019) и «Тайна вешенки[®]» (ТУ 9190-037-87552538-15, ДС: ТС N RU Д-RU.АБ52.В.02872 от 08.11.2016 до 07.11.2019). Производимые продукты, помимо входящих в них биологически активных веществ

самого измельченного мицелия, дополнительно обогащены природными антиоксидантами (дигидрохверцетин и аскорбиновая кислота). Пищевые концентраты отличаются только видом наполнителя.

Так, пищевой концентрат «Грибной чудодей®» в качестве наполнителя содержит быстрый углевод мальтодекстрин. Вещества, входящие в его состав, энергетически пополняют организм человека, принимают участие в процессах обмена, обладают жизненно важными свойствами. За счет этого наполнителя пищевой концентрат имеет высокую энергетическую ценность 350-370 ккал/100г.

В качестве наполнителя в пищевом концентрате «Тайна вешенки®» используют полидекстрозу, которая представляет собой пребиотические водорастворимые пищевые волокна. Калорийность продукта 120-125 ккал/100г.

Проведенный в Институте радиобиологии НАН Беларуси (г. Гомель) в течение 20 последних лет комплекс медико-биологических исследований и доклинических испытаний по изучению радиозащитных свойств производимых в настоящее время пищевых концентратов на основе мицелия *Pleurotus ostreatus* 1137 показал, что применение препаратов в условиях острого и пролонгированного гамма-облучения уменьшает накопление радионуклидов, накопление продуктов перекисного окисления липидов, активируют антиоксидантную систему организма, способствуют восстановлению количества форменных элементов периферической крови животных, а также способствует быстрому выведению инкорпорированных радиоизотопов. Важно, что связывание радионуклидов происходит в кишечнике, вследствие чего их накопление в органах и тканях существенно снижается. Установлено также, что препараты на основе мицелия вешенки проявляют не только декорпорирующий эффект, но и являются средствами детоксикации организма и коррекции нарушенного метаболизма, обусловленного развивающимся радиационным эндотоксическим синдромом [1, 3].

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что производимые в настоящее время пищевые концентраты под торговыми марками «Грибной чудодей®» и «Тайна вешенки®» могут применяться в качестве лечебно-профилактических средств:

- при переутомлении и снижении защитных сил организма;
- для защиты организма от неблагоприятного действия окружающей среды, особенно в условиях проживания в экологически неблагоприятных районах с радиоактивным загрязнением местности, а также при работе на вредных для здоровья производствах;
- при отравлениях токсичными веществами и соединениями тяжелых металлов;
- при нахождении в зонах с повышенным радиационным фоном.

Список литературы

1. Герасименя В.П. Экстракты базидиальных грибов и их полифункциональная медико-биологическая активность: монография / В.П.Герасименя, К.З.Гумаргалиева, С.В.Захаров, Т.И.Милевич, А.В.Трезвова; под ред. В.П.Герасимени, В.Ю.Полякова.- М.: ИХФ РАН, ООО «Инбиофарм», 2014. - 128 с.
2. Герасименя В.П. Инновационные биотехнологии промышленного культивирования грибов *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm, используемых в фармацевтической практике для создания медицинских препаратов: монография/ В.П.Герасименя, С.В.Захаров, В.М.Брусникин, М.А.Клыков, Л.П.Семашева; под ред. В.П.Герасимени, В.Ю.Полякова. - М.: ИХФ РАН, ООО «Инбиофарм», 2013.- 212 с.
3. Милевич Т.И. Радиозащитный эффект препаратов вешенки после воздействия гамма-излучения: тезисы докладов / Т.И.Милевич, Е.Ф.Конопля, В.П.Герасименя, С.В.Захаров, [и др.] // Материалы международной научной конференции, Гомель, 14-15 октября. - 2010. - С. 69-70.

МЕДИКАМЕНТОЗНЫЕ СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ И РАННЕЙ ЭКСТРЕННОЙ ТЕРАПИИ РАДИАЦИОННЫХ ПОРАЖЕНИЙ. СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Гладких В.Д.¹, Гребенюк А.Н.²

¹ФГУП Научно-производственный центр «Фармзащита» ФМБА России,
г. Химки Московская обл. e-mail: Gladkich2007@rambler.ru

²ООО «Специальная и Медицинская Техника», Санкт-Петербург

Резюме. Приведена сравнительная характеристика медикаментозных средств профилактики и ранней экстренной противолучевой терапии, разрешенных к применению и производимых в Российской Федерации. Дается обзор приоритетных направлений научных исследований, направленных на совершенствование средств противорадиационной защиты и оптимизации системы профилактики и ранней терапии лучевой патологии.

Ключевые слова: Радиационные поражения, радиомитигаторы, радиопротекторы, противолучевые средства.

MEDICATIONS PREVENTION AND EARLY EXTERNAL THERAPY OF RADIATION INJURIES. THE STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT

GLADKIKH V.D.¹, GREBENYUK A. N.²

¹FSUE RPC «Pharmaceutical Protection» of Federal Medical-Biological Agency of Russia,
Khimki, Moscow region. e-mail: Gladkich2007@rambler.ru

²ООО «Special and medical equipment», Saint-Petersburg

Summary. Comparative characteristic of drugs of prevention and early emergency radioprotective therapy, approved for use and manufacture in the Russian Federation. The review of priority directions of scientific researches directed on improvement of means of radiation protection and optimization of system of prevention and early therapy of radiation pathology is given.

Key words: Radiation damage, radiomitigators, radioprotectors, radioprotective funds/

Одной из первостепенных задач по осуществлению комплекса мероприятий, направленных на нейтрализацию радиационных угроз и развитие ресурсного обеспечения функциональных элементов национальной системы радиационной безопасности, является разработка и применение медицинских технологий профилактики и терапии нарушений здоровья, связанных с негативным воздействием радиации.

Для профилактики и лечения различных нозологических состояний, сопровождающих реализацию эффектов радиационного воздействия, к настоящему времени разработан, апробирован и рекомендован к практическому применению широкий перечень медикаментозных средств противолучевой защиты различного механизма действия. Из всего множества потенциальных противорадиационных средств Минздравом Российской Федерации для использования в клинической практике разрешено ограниченное количество фармакологических препаратов и изделий медицинского назначения для профилактики и раннего экстренного лечения радиационных поражений.

В настоящем сообщении рассмотрены вопросы состояния производства медикаментозных средств профилактики и ранней экстренной терапии радиационных поражений в Российской Федерации. Приведена характеристика радиопротекторов, радиомитигаторов (Препарат «Б-190», Нафтизин, Рибоксин, поливитаминовые и витаминно-аминокислотные комплексы, Дезоксинат), средств профилактики и купирования первичной реакции на облучение (Латран), средств профилактики поражений от облучения инкорпорированными радионуклидами (Ферроцин, Пентацин, Калия йодид) и средств экстренной патогенетической терапии острой лучевой болезни (Беталейкин), производимых и разрешенных к применению на территории Российской Федерации.

С учетом оценки эффективности и переносимости рассматриваемых противолучевых средств, выделены «уязвимые» места в существующей системе медикаментозной профилактики и ранней экстренной терапии радиационных поражений.

Приводится краткий обзор основных направлений научных исследований, направленных на оптимизацию системы медикаментозной профилактики и ранней экстренной терапии радиационных поражений. На основании мониторинга научных исследований, проводимых за рубежом и в нашей стране, выделены приоритетные направления разработки противолучевых средств:

- радиопротекторов, стимуляторов радиорезистенции широкого спектра биологической активности (антиоксиданты, ингибиторы NO-синтазы и апоптоза, индукторы ферментов репарации ДНК, стимуляторы гемо и - иммунопоеза и пр.);

- пероральных малотоксичных сорбентов для выведения инкорпорированных радиоизотопов из организма;

- средства профилактики и купирования первичной реакции на облучение.

Первое направление связано с исследованием природных соединений растительного и бактериального происхождения и их синтетических аналогов (5-андростендиол; мелатонин; флагеллины; изофлавоны, выделенные из сои; фенилацетат и фенилбутират; бензилстирилсульфоны; эпигаллокатехин галлат; миметики супероксиддисмутазы; ингибиторы дипептидилпептидазы; комплексные соединения металлов с витаминами и пр.).

В рамках второго направления представляют интерес работы, связанные с разработкой пероральных хелаторов на основе кальций тринатриевой соли диэтиленetriаминпентауксусной кислоты (пероральная форма Ca-DTPA на основе наночастиц и поверхностно-активных веществ) и гидроксипиридона (НОРО-хелаторы). Важным преимуществом НОРО – хелаторов является их низкая токсичность и эффективность при пероральном способе введения (в сравнительных опытах показано, что при пероральном введении они в три раза более эффективны, чем пентацин при внутривенном способе введения).

В рамках третьего направления приоритет принадлежит разработке композиций на основе антагонистов серотониновых (5Н₃) и тахикининовых (NK₁) рецепторов.

На основании анализа состояния научно-технологической, производственной и нормативно-правовой базы, лежащей в основе сложившейся в Российской Федерации системы медикаментозной противолучевой защиты с учетом потенциальных радиационных угроз выделены основные направления её оптимизации:

- а) Идентификация пробелов в областях знаний, имеющих критическое значение для разработки медицинских средств защиты от негативного воздействия радиации.

- б) Проведение фундаментальных и поисковых исследований по теоретическим основам разработки инновационных средств профилактики и терапии радиационной

патологии, исходя из современных данных об этиопатогенетических механизмов действия.

в) Разработка научных основ и критериев экспертной оценки эффективности противолучевых средств в зависимости от механизмов их действия, продолжительности защитного эффекта, времени экспозиции в сочетании с данными по частоте их применения с целью обновления номенклатуры и пополнения списка новыми высокоактивными препаратами.

г) Разработка научно-методических, организационно-правовых материалов по внедрению стандартов проведения доклинических, клинических исследований и производства лекарств (GLP, GCP, GMP), исходя из специфики применения средств профилактики и терапии радиационных поражений.

д) Экспериментально-клинические исследования, направленные на разработку инновационных лекарственных препаратов для выведения из организма инкорпорированных радиоизотопов; лекарственных препаратов, повышающих радиорезистентность организма; лекарственных препаратов противодействия развитию отдаленных последствий облучения низкой интенсивности.

е) Научные исследования, направленные на оптимизацию системы профилактики и экстренной ранней терапии радиационных поражений.

ж) Разработка современных лекарственных форм и технических средств применения медикаментозных средств радиационной защиты.

Список литературы

1. Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиационных поражений /Под ред. В.Д. Гладких. - М.: Комментарий, 2015. -0 304 с.

2. Гребенюк А.Н., Легеза В.И., Гладких В.Д. [и др.] Практическое руководство по использованию медицинских средств противорадиационной защиты при чрезвычайных ситуациях и обеспечению ими аварийных медико-санитарных формирований и региональных аварийных центров. М.: Комментарий, 2017. - 304 с.

3. Гладких В.Д., Белых В.Г., Тимошевский А.А., Чиж И.М. Организация лечебно-профилактических мероприятий при радиационных поражениях //Военно-медицинский журнал. – 2016 - № 11. – С. 19 – 26.

4. Гладких В.Д., Белых В.Г., Тимошевский А.А., Чиж И.М. Специальные средства медицинской противохимической и противорадиационной защиты: современное состояние и перспективы развития //Военно-медицинский журнал. – 2017 - № 1. – С. 29 – 35.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СКАРМЛИВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ^{137}Cs ПИЩИ И КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ А, Е, С НА ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ БЕЛЫХ КРЫС

А.И. Грицук, В.Т. Свергун, А.Н. Коваль, С.М. Сергеенко

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь,
e-mail: gritsuk@inbox.ru

Резюме. При воздействии инкорпорированного ^{137}Cs в дозе 9600 мкГр и приеме антиоксидантных препаратов в скелетных мышцах белых крыс отмечено увеличение $V_{\text{энд}}$, увеличение показателей $\text{СД}_{\text{як}}$ и $\text{СД}_{\text{днф}}$. При внутреннем облучении от ^{137}Cs в дозе 21 мкГр подобных изменений не отмечено. Также не наблюдалось значимых изменений показателей метаболизма глутамата и креатина. Предполагается, что применение антиоксидантного комплекса способствует адаптации энергообразующих систем скелетных мышц к действию инкорпорированного ^{137}Cs .

Ключевые слова: скелетные мышцы, ^{137}Cs , антиоксидантный комплекс витаминов, полярография, митохондриальное дыхание.

STUDY OF EFFECT OF ^{137}Cs CONTAMINATED FOOD AND A, E, C VITAMIN COMPLEX ON THE PARAMETERS OF ALBINO RATS SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIAL RESPIRATION

A.I. Gritsuk, V.T. Svergun, A.N. Koval, S.M. Sergeenko

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus,

e-mail: gritsuk@inbox.ru

Summary. There was observed an increase in V_{end} , an increase in the rates of SD_{suc} and SD_{dnp} in albino rats skeletal muscles when exposed to ^{137}Cs at a dose of 9600 μGy and antioxidant preparations intake. There were no such changes noted after internal irradiation from ^{137}Cs at 21 μGy dose. Also, there were no significant changes in metabolism of glutamate and creatine. It is assumed that the use of the antioxidant complex contributes to the adaptation of energy-producing systems of skeletal muscles to incorporated ^{137}Cs action.

Key words: skeletal muscles, ^{137}Cs , antioxidant vitamins complex, polarography, mitochondrial respiration.

Кислород, необходимый для жизнедеятельности аэробных организмов, расходуется на митохондриальные, микросомальные и пероксидные процессы. Митохондриальное окисление (до 85% потребляемого кислорода) обеспечивает энергообразование, однако может сопровождаться усилением образования активных форм кислорода. Этот эффект регулируется путем разобщения окислительного фосфорилирования (ОФ), которое сопровождается увеличением потребления кислорода [1]. Добавление антиоксидантного комплекса витаминов (АОК) уменьшает долю пероксидного окисления.

Скелетная мускулатура, помимо двигательной, выполняет и ряд иных функций. Метаболизм скелетных мышц связан межорганными связями с печенью и почками. Ионизирующие излучения влияют на функции указанных органов, поэтому представляет интерес исследование в скелетных мышцах состояния тканевого дыхания при воздействии инкорпорированного ^{137}Cs , а также оценить возможность коррекции возникающих при этом нарушений с помощью АОК.

Цель исследования: изучение показателей митохондриального дыхания скелетных мышц при добавлении в рацион белых крыс пищи, загрязненной радионуклидами ^{137}Cs , растительного масла и АОК.

Материалы и методы исследований: В работе использовались беспородные белые крысы массой 220-250 г. В эксперименте учтены рекомендации Рабочей группы Федерации европейского сообщества по науке о лабораторных животных [2]. Животные были распределены на контрольную и четыре экспериментальные группы, в рацион которых добавляли следующие компоненты: Контроль: стандартный рацион вивария; Группа «АОК»: витамины (разовая доза): С – 0,2; А – 0,002; Е – 0,08 мг/г веса крысы; Группа «Масло»: растительное подсолнечное масло (0,002 мл/ г веса крысы); Группа 1: 1,3 г мяса кабана/сут; на 5, 7, 9, сутки АОК ($A_{Cs} = 56256$ Бк/кг, $D = 9600$ мкГр); Группа 2: 0,1 г мяса кабана/сут, на 5, 7, 9, сутки АОК ($A_{Cs} = 1256$ Бк/кг, $D = 21$ мкГр). A_{Cs} – конечная удельная активность ^{137}Cs в тушках крыс; D – рассчитанная поглощенная доза от β -излучения инкорпорированного ^{137}Cs .

Введения АОК, масла и ^{137}Cs проводили по следующей схеме: группы «АОК» и «Масло» получали, соответственно, АОК или масло на 1, 3, 5, 7 и 9 дни эксперимента; группам 1 и 2 скармливали ^{137}Cs в виде мяса дикого кабана с удельной активностью по ^{137}Cs 600 Бк/г все 9 дней эксперимента. Жирорастворимые витамины вводились в виде раствора в растительном масле, витамин С – в виде водного раствора [3]. АОК вводился перорально с помощью пищеводного металлического зонда. Забой животных путем декапитации производили на 10-е сутки эксперимента.

Для оценки митохондриального окисления после декапитации животных, извлеченный орган немедленно освобождали от соединительнотканых элементов, промывали в охлажденном физиологическом растворе и пропускали через плунжер с диаметром отверстий 0,5 мм. Полученные тканевые препараты помещались в среду Хенкса, затем в термостатируемую полярографическую ячейку объемом 2 мл при $+25^\circ\text{C}$, где с помощью закрытого электрода Кларка, подключенного к полярографу ПУ-1 (Беларусь), измеряли скорость потребления кислорода тканевым препаратом. С момента забоя животного до начала записи полярограммы проходило не более 5 минут. Исследовали следующие показатели митохондриального окисления: скорости дыхания, выраженные в нмоль $\text{O}_2/(\text{мин} \times \text{мг}$ белка): $V_{\text{энд}}$ – на эндогенных субстратах, $V_{\text{як}}$ – при добавлении препарата янтарной кислоты, нейтрализованной раствором КОН, $V_{\text{глу}}$ – препарата глутаминовой кислоты, нейтрализованной раствором КОН, $V_{\text{кре}}$ – препарата креатина и $V_{\text{днф}}$ – спиртового раствора 2,4-ДНФ, а также рассчитывали показатели $\text{СД}_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$ и $\text{СД}_{\text{днф}} = V_{\text{днф}}/V_{\text{як}}$, $\text{СД}_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$, $\text{СД}_{\text{кре}} = V_{\text{кре}}/V_{\text{глу}}$. Содержание белка в тканевых препаратах определяли биуретовым методом.

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием программы GraphPad Prism v. 5.00, с использованием параметрических (однофакторный дисперсионный анализ [ANOVA] и тесты множественных сравнений Бонферрони и Даннета) и непараметрических (Манна-Уитни) критериев в зависимости от результатов теста на нормальное распределение экспериментальных данных (тесты Колмогорова-Смирнова, Д'Агостино и Пирсона, Шапиро-Уилка) [3, 5].

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что препараты скелетной мускулатуры отличаются чувствительностью к алиментарному воздействию масла и инкорпорированного ^{137}Cs . В первую очередь, эти воздействия влияют на показатель $V_{\text{энд}}$, где статистически значимое увеличение данного показателя отмечены для групп «Масло» ($5,89 \pm 0,24$) и группы 2 ($6,37 \pm 0,30$). Показатели скорости дыхания всех групп при внесении янтарной кислоты и динитрофенола не отличались от контрольных значений, однако для соответствующих коэффициентов выявлено статистически значимое снижение показателя $\text{СД}_{\text{як}}$ в группе 2, и увеличение $\text{СД}_{\text{днф}}$ в группах АОК и 1. Для $V_{\text{глу}}$ статистически значимое увеличение отмечено только в группе 1, в то время как существенных изменений для показателя $\text{СД}_{\text{глу}}$ не отмечалось. Внесение в ячейку

креатина также не сопровождалось статистически значимыми изменениями $V_{\text{кре}}$ и $СД_{\text{кре}}$ во всех группах животных.

Отмеченные изменения могут свидетельствовать о следующем.

1. Стимуляция дыхания при добавлении в рацион животных масла может быть связана с увеличением вклада жирных кислот в энергетику скелетных мышц, вызывая конкуренцию за ФАД между системой β -окисления жирных кислот и сукцинатдегидрогеназой. Об этом свидетельствует наличие тенденции к снижению показателя $СД_{\text{як}}$ для всех групп, достигающего статистически значимых различий в группе 2.
2. Внесение в яичку экзогенных глутамата и креатина не приводило к существенным изменениям изучаемых показателей (за исключением увеличения $V_{\text{глю}}$ в гр. 1), что может объясняться устойчивостью указанных метаболических систем к воздействию ионизирующих излучений и введению АОК.
3. Увеличение показателя $СД_{\text{днф}}$ отражает лабилизацию системы сопряжения ОФ при воздействии АОК. При этом введение совместно АОК с маслом, а также воздействие инкорпорированного ^{137}Cs в дозе 9600 мкГр (гр. 1) приводит к увеличению $СД_{\text{днф}}$, в то время как в группе 2 данный показатель почти не отличается от контрольного значения.

Выводы:

1. В группе животных, получавших с рационом подсолнечное масло, наблюдается статистически значимое увеличение скорости дыхания на эндогенных субстратах. Такие же изменения отмечались и в группе животных с дозой внутреннего облучения 21 мкГр (гр. 2).
2. Внесение в яичку янтарной кислоты во всех исследуемых группах сопровождалось тенденцией к снижению показателя $СД_{\text{як}}$, статистически значимое в группе 2, что можно объяснить конкуренцией ФАД-зависимых дегидрогеназ системы β -окисления жирных кислот и сукцината.
3. Стабильность показателей, отражающих метаболизм глутамата и креатина, указывает на устойчивость этих систем к внутреннему ионизирующему излучению и пероральному введению масла и антиоксидантного комплекса витаминов.
4. Увеличение $СД_{\text{днф}}$ подтверждает предположение об лабилизации системы сопряжения ОФ при нахождении животных на высокожировой диете.
5. Таким образом, применение антиоксидантного комплекса витаминов в условиях инкорпорации ^{137}Cs оптимизирует метаболическую ситуацию в скелетной мускулатуре, способствуя адаптации энергообразующих систем скелетных мышц к внутреннему облучению.

Литература

1. Грицук, А.И. Цезий, митохондрии и проблемы кардиологии // А.И. Грицук, А.Г. Мрочек, Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2008, №4. – С.63–75.
2. Копаладзе Р. А. Методы эвтаназии экспериментальных животных – этика, эстетика, безопасность персонала // Успехи физиол. наук. – 2000. – Т. 31, № 3. – С. 79–90.
3. Грицук, А.И., Влияние витаминов А, Е, С на дыхательную активность лимфоцитов селезенки / А.И. Грицук, А. Кадер, А.Н. Коваль, С.М. Сергеев, В.Т. Свєргун // Вопросы питания. – т. 77, № 1. – 2008. – С. 26-29.
4. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. 2002. – 312 с.
5. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М., 1998. – 459 с.

ПУТИ РЕПАРАЦИИ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЖИВОТНЫХ

*Л.В. Грубская¹, А.В. Клепко¹, С.Н. Канюк²,
Т.И. Гавриш³, С.В. Андрейченко, И.Н. Гудков¹*

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,

²Национальный научный центр радиационной медицины, Киев, Украина, ³Ивано-Франковский национальный медицинский университет, Ивано-Франковск, Украина,

e-mail: alla.klepko@gmail.com

Резюме. Изучали репарационные свойства ДНК сперматозоидов крыс. Установили, что инцизионно-эксцизионная репарация ДНК имеет место при фертилизации после попадания отцовского нуклеогистона в цитоплазму ооцита II. Предпосылкой для эффективного протекания репарации ДНК сперматозоидов являлась повышенная экспрессия гена RAD 54 материнского генома в период образования и существования мужского пронуклеуса.

Ключевые слова: репарация, ДНК, сперматозоид, гамма-облучение

THE WAYS OF RADIATION DAMAGES IN ANIMAL SPERMATOZOID DNA REPAIR

*L.V. Grubskaya¹, A.V. Klepko¹, S.M. Kanjuk², I.T. Gavrysh³,
S.V. Andreychenko, I.M. Gudkov¹*

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, ²National

Scientific Center for Radiation Medicine, Kyiv, Ukraine, ³Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine, e-mail: alla.klepko@gmail.com

Summary. The spermatozoid DNA repair qualities have been studied. The incision-excision DNA repair of spermatozoid DNA was established to take place upon fertilization after paternal nucleohistone penetration in the oocyte II cytoplasm. The premise for the effective spermatozoid DNA repair was shown to be the increase in RAD 54 gene expression of maternal genome concurrently with the male pronucleus formation and its further continuous existing.

Key words: repair, DNA, spermatozoa, gamma-irradiation

Сперматозоиды являются высокодифференцированными мужскими гаметами, которые вырабатываются половозрелыми мужскими особями в процессе сперматогенеза и служат для доставки мужского генома в женский организм. При этом взаимодействие сперматозоида с ооцитом II, в частности у крыс и других лабораторных животных, приводит вначале к завершению редукционного деления и образованию яйцеклетки, а затем уже к осуществлению сингамии с последующим зиготообразованием и эмбриогенезом.

При спермиогенезе происходит ремодуляция хроматина, его протаминирование и конденсация, что также сопровождается значительной редукцией цитоплазмы и нуклеоплазмы, потерей эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи. При этом сохранившиеся отдельные клеточные органеллы, в частности митохондрии, центриоли и одна лизосома в виде акросомы, становятся пространственно разобщенными и локализуются в разных физиологических компартментах.

В этой связи, маловероятным представляется протекание репарации ДНК в самих сперматозоидах с помощью общеизвестных механизмов [1]. В то же время, накопление радиационных повреждений в отцовском комплименте хромосом, может

становиться причиной повышенной генетической нестабильности, появления хромосомных и геномных мутаций, а также возникновения доминантных леталей и эмбриональной смертности [2-4].

Целью настоящего исследования было изучение репарационных свойств ДНК сперматозоидов крыс, а также выяснение необходимых и достаточных условий для осуществления репарации ДНК в мужских гаметах.

Облучение тестикул животных проводили гамма-лучами при мощности дозы 106,6 сГр/мин локально в дозах 1–10 Гр, при этом остальная часть тела животного была экранирована свинцовым жилетом. Получение спермы для построения спермограммы, проведения цитофлуорометрии и внутриматочной инсеминации осуществляли с помощью электроэякуляции. Определение одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК определяли с помощью TUNEL-метода на проточном цитофлуориметре. Суперовуляцию самок крыс инициировали предварительной гормональной подготовкой гонадотропинами. Оплодотворенные ооциты II сперва культивировали на искусственной комплексной питательной среде, а затем из них экстрагировали мРНК и проводили количественный ПЦР в реальном времени по индуцибельным генам RAD 51 и RAD 54, в качестве стандарта используя конституционный ген 18S рРНК. Выделение пронуклеусов из ооцитов II проводили с помощью градиентного ультрацентрифугирования. Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами вариационной статистики.

В результате проведенных исследований было показано, что в зрелых сперматозоидах, находящихся в эякуляте, репарация ДНК отсутствует, что обуславливает накопление разрывов ДНК в прямой зависимости от поглощенной тестикулами дозы гамма-облучения. Осуществление репарации ДНК сперматозоидов начинается после проникновения ядерного материала сперматозоида в ооцит II, что по времени совпадает с депротаминированием хроматина отцовского генома. В период образования отцовского пронуклеуса зафиксирована максимальная экспрессия генов RAD 51 и RAD 54, которая постепенно снижалась к моменту начала сингамии и появления первой метафазы. Есть все основания полагать, что повышенная активность вышеупомянутых генов обусловлена в значительной мере экспрессией материнского генома, поскольку в спермальных сперматозоидах эти гены не проявлялись. Усиленная экспрессия RAD 54 способствовала задержке наступления сингамии, а также продолжительному пребыванию отцовского пронуклеуса в состоянии покоя при одновременной синхронизации его клеточного цикла с клеточным циклом женского пронуклеуса [5, 6]. Опыты по внеплановому синтезу ДНК выявили протекание такого синтеза именно в мужских пронуклеусах, а не в женских, что указывает на запуск инцизионно-эксцизионной репарации в ДНК сперматозоидов при условии нахождения отцовского нуклеогистона в цитоплазме женских гамет.

Дальнейший анализ наличия разрывов в ДНК мужских пронуклеусов продемонстрировал их заметное количественное уменьшение по сравнению с теми показателями, которые были получены на индивидуальных сперматозоидах эякулята. При этом оказалось, что полнота репарации ДНК сперматозоидов, пребывающих в цитоплазме ооцита II, прямым образом зависит от длительности нахождения мужского нуклеогистона на стадии мужского пронуклеуса.

Таким образом, проведенные исследования убедительно показали, что репарация ДНК сперматозоидов происходит непосредственно при фертилизации, что дает возможность элиминировать генетические повреждения ДНК отцовского генома до начала эмбриогенеза и тем самым в значительной степени воспрепятствовать появлению генетической нестабильности, неблагоприятной наследственной изменчивости и врожденных генетических аномалий у образовавшегося потомства.

Список литературы

1. Gunes S., Al-Saddan M., Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility // *Reproductive BioMedicine Online*. 2015. Vol. 31. P. 309–319.
2. Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De luliis G.N Oxidative stress and male reproductive health // *Asian J. Anrol*. 2014. Vol. 16. P. 31–38.
3. Dubrova Y.E., Nesterov V.N., Krouchinsky N.G., Ostapenko V.A., Neumann R., Neil D.L., Jeffreys A.J. Human minisatelite mutation rate after the Chernobyl accident // *Nature*. 1996. Vol. 380. P. 683–686.
4. Marchetti F., Essers J., Kanaar R., Wyrobek A.J. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104. P. 17725–17729.
5. Lyama T., Wilson D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells // *DNA repair*. 2013. Vol. 12, № 8. P. 620–636.
6. Shimura T., Inoue M., Taga M. [et al.] p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm // *Mol. Cell Biol*. 2002. Vol. 22. P. 2220–2228.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА-Антиоксиданта ПЕРОКСИРЕДОКСИН 2

Шарапов М.Г.¹, Новоселов В.И.¹, Брусков В.И.², Гудков С.В.^{3,4}

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия, ²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия, ³Институт общей физики им.

А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия, ⁴Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, e-mail: S_makariy@rambler.ru

Резюме. Рекомбинантный белок Prx2 защищает мышей от действия рентгеновского излучения в летальных и сублетальных дозах. Эффективен при внутривенном введении не за долго до действия ионизирующей радиации. Фактор изменения дозы – 1,25. Prx2 эффективно уменьшает тяжесть радиационно-индуцированной лейко- и тромбопении у мышей и количество повреждений ДНК в клетках красного костного мозга. По-видимому, радиозащитный эффект Prx2 и его влияние на адаптивный ответ может быть связано не только с его ферментативными активностями, но и с его сигнально-регуляторной функцией.

Ключевые слова: облучение, пероксиредоксин 2, рекомбинантные белки, радиозащита

STUDY OF THE RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF PROTEIN-ANTIOXIDANT PEROXIREDOXIN 2

Sharapov M.G.¹, Novoselov V.I.¹, Bruskov V.I.², Gudkov S.V.^{3,4}

¹Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia, ²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia, ³Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow, Russia, ⁴ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russia, e-mail: S_makariy@rambler.ru

Summary. Recombinant Prx2 protein protects mice from X-ray radiation in the lethal and sublethal doses. Effective when administered intravenously, not long before the action of radiation. The dose reduction factor – 1,25. Prx2 effectively reduces the severity of radiation-induced leukemia and thrombopenia in mice and the amount of DNA damage in red bone marrow cells. Apparently, the radio-protective effect of Prx2 and its influence on the adaptive response may be due not only to its enzymatic activity, but its signal-regulatory function.

Key words: irradiation, peroxyredoxin 2, recombinant proteins, radioprotection

Пероксиредоксины (Prx) – эволюционно древнее семейство пероксидаз, которые играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Эти ферменты обладают широкой субстратной специфичностью и нейтрализуют гидропероксиды как органической, так и неорганической природы. Функции Prx1-6 в клетке весьма разнообразны и не ограничены лишь пероксидазной активностью. Благодаря структурно-функциональным особенностям Prx участвуют в межклеточных и внутриклеточных сигнальных путях, а также, благодаря шаперонной активности препятствуют денатурации белков в условиях окислительного стресса. Сегодня известно большое количество радиозащитных веществ [1]. Как показано нами ранее на модели тотального облучения мышей сублетальными и летальными дозами рентгеновского излучения пероксиредоксины, на примере Prx6, тоже являются радиопротекторами [2,3]. Prx6 принадлежит к семейству 1-Cys Prx, логическим продолжением наших исследований явились испытания радиозащитных свойств пероксиредоксина из другого семейства 2-Cys Prx, а именно Prx2.

Получен рекомбинантный белок Prx2, который в условиях *in vitro* обладает наибольшей пероксидазной активностью, а также наибольшей стабильностью среди Prx. Кроме того, Prx2 в отличие от большинства пероксиредоксинов сохраняет не менее 90% своей ферментативной активности в более широком диапазоне pH и температур. Мы предполагаем, что более высокая термостабильность Prx2 связана с их шаперонной активностью, которая, как известно, препятствует термической агрегации. Для проверки потенциальной радиопротекторной активности Prx2 проведено испытание активности *in vitro* по нейтрализации долгоживущих радикалов белков (ДЖРБ), которые получали с помощью облучения рентгеновскими лучами (7-10 Гр) раствора бычьего сывороточного альбумина. По эффективности нейтрализации ДЖРБ Prx2 оказались крайне эффективными.

Исследование радиозащитных свойств Prx2 в условиях *in vivo* на животных также показало их эффективность. Важным вопросом является определение оптимального способа и времени введения Prx2 в организм лабораторных животных относительно действия ионизирующей радиации. Установлено, что при внутримышечном и внутрибрюшинном введении Prx2 не оказывает существенного радиозащитного влияния. Максимальный эффект наблюдался при введении белка Prx2 внутривенно за 15 минут до воздействия ионизирующей радиации, к 30 суткам после облучения наблюдается 70% выживших животных. В такой схеме исследовано несколько концентраций Prx2, наиболее эффективной концентрацией при введении его внутривенно за 15 мин до рентгеновского облучения является 20 мкг/г. Фактор изменения дозы (ФИД) для Prx2 ~ 1,25.

Проведено исследование влияния экзогенного Prx2 на изменение гематологических показателей у животных подвергнутых воздействию ионизирующей радиации (7 Гр). Установлено, что Prx2 в существенной степени уменьшает тяжесть радиационно-индуцированной лейкопении и тромбопении. Показано, что Prx2 существенно уменьшает степень радиационно-индуцированной поврежденности ДНК клеток красного костного мозга.

Адаптивный ответ, по большому счету представляет собой реакцию клеток на облучение в малых дозах (обычно для мышей используется прекондиционирующая доза от 3 до 15 сГр), выражающуюся в приобретении устойчивости к поражающему действию излучения в большой дозе (проявляющая доза, обычно от 1 до 4 Гр). Зачастую для изучения адаптивного ответа используются методы оценки поврежденности ДНК. Известно, что адаптивный ответ регистрируется, если между получением прекондиционирующей и проявляющей дозы проходит не менее 5 часов, оптимальным временем являются сутки. Показано, что введение Prx2 интактным мышам существенно не влияет на количество полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) содержащих микроядра (МЯ). Тотальное облучение мышей в дозе 0,1 Гр приводит к увеличению количества ПХЭ с МЯ, по сравнению с интактными животными. Введение Prx2 за 15 мин до облучения животных в дозе 0,1 Гр нормализует количество ПХЭ с МЯ до контрольных значений. После облучения животных в дозе 1,5 Гр процент ПХЭ с МЯ увеличился в 9 раз. В случае, когда животные предварительно были подвергнуты действию ионизирующей радиации в прекондиционирующей дозе 0,1 Гр, дальнейшее их облучение через сутки в дозе 1,5 Гр не приводило к такому значимому увеличению количества ПХЭ с МЯ, как в случае облучения интактных мышей в дозе 1,5 Гр, то есть проявляется адаптивный ответ. Если перед прекондиционирующей дозой 0,1 Гр вводится Prx2, адаптивного ответа не наблюдается. Таким образом, введение Prx2 способно нивелировать адаптивный ответ клеток на действие ионизирующей радиации.

Было исследовано влияние рентгеновского излучения (1,5 Гр) на экспрессию некоторых «стрессовых» генов в клетках костного мозга, а также влияние экзогенного Prx2 на уровень экспрессии этих генов. Были проанализированы следующие гены изменяющие уровень экспрессии при развитии окислительного стресса (CAT, HO-1, SOD1-3, Prx1-6, NRF2, KEAP), воспалительного процесса (Nfkb, Nkrf, TNFa, IL6, HSP70, HSP90), апоптоза (p53, Caspase3, ATR, AP1), репарации ДНК (LigIV, ATM, XRCC4, XRCC5) и регенерации клеток (ki67). Спустя 1 сутки после облучения в контрольной группе (не получавших инъекцию Prx2) и облученных 1,5 Гр наблюдаются значительные изменения в уровне экспрессии большей части исследуемых генов. Особенно сильный рост наблюдается для генов антиоксидантного ответа и репарации ДНК. В случае введения Prx2 до облучения 1,5 Гр наблюдается нормализация уровня экспрессии исследованных генов, что, по-видимому, связано с коррекцией уровня АФК и нормализацией окислительно-восстановительного гомеостаза клеток.

Мы предполагаем, что радиозащитный эффект Prx2, состоит из нескольких составляющих: 1) высокая пероксидазная активность, обеспечивающая нейтрализацию широкого спектра перекисных субстратов, 2) сигнально-регуляторная функция, которая в стрессовых условиях способствует запуску восстановительных процессов клетки, 3) шаперонная активность 2-Cys Prx, проявляющаяся в условиях окислительного стресса, препятствует денатурации важнейших белков клетки и межклеточного пространства, способствуя более быстрому восстановлению пораженных тканей. Таким образом, Prx2 может рассматриваться как потенциально перспективное радиозащитное и профилактическое средство для устранения и уменьшения рисков повреждающего воздействия ионизирующего излучения на организм млекопитающих

Работа поддержана грантом РФФИ 17-44-500476-р_а.

Список литературы

1. Гудков С.В., Попова Н.Р., Брусков В.И. Радиозащитные вещества: история, тенденции и перспективы // Биофизика. 2015. Т. 60, вып. 4, с. 801–811.
2. Шарапов М.Г., Гудков С.В., Гордеева А.Е. [и др.] Пероксиредоксин 6 – природный радиопротектор // ДАН. 2016. Т. 467, № 3, с. 355–357.
3. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E. [и др.] The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals // Free Radical Research 2017. Vol. 51(2). P. 148–166

СОВРЕМЕННЫЕ СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ И КУПИРОВАНИЯ ДИСПЕПСИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПЕРВИЧНОЙ РЕАКЦИИ НА ОБЛУЧЕНИЕ

И.С. Драчев¹, В.И. Легеца², А.Б. Селезнев¹, Е.Б. Супрунова¹

¹ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации,

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»,

Санкт-Петербург, Россия

e-mail: dr.ingwar@mail.ru

Резюме. Диспепсические проявления первичной реакции на облучение (тошнота, рвота, диарея) существенным образом снижают трудоспособность пораженных в ранние сроки после воздействия ионизирующих излучений. В опытах на собаках, облученных в дозах 20 и 30 Гр проведена оценка специфической противорвотной и антидиарейной активности антагонистов дофаминовых, серотониновых и нейрокининовых рецепторов. Показано, что наиболее эффективным является блокатор 5-HT₃ рецепторов палонсетрон.

Ключевые слова: первичная реакция на облучение, рвота, диарея, метоклопрамид, ондансетрон, палонсетрон, апрепитант.

MODERN MEDICINES FOR PREVENTION OF DYSPEPTIC MANIFESTATIONS OF THE PRODROMAL STAGE OF ACUTE RADIATION SYNDROME

I.S. Drachev¹, V.I. Legeza², A.B. Seleznev¹, E.B. Suprunova¹

¹ State Scientific Research Test Institute of the military medicine
of the Defense Ministry of the Russian Federation,

² S.M. Kirov Military Medical Academy,

St. Petersburg, Russia,

e-mail: dr.ingwar@mail.ru

Summary. Dyspeptic manifestations of the prodromal stage of acute radiation syndrome (nausea, vomiting, diarrhea) significantly reduce the work capacity of the affected in the early periods after exposure to ionizing radiation. In experiments on dogs irradiated at doses of 20 and 30 Gy, an assessment was made of the specific antiemetic and antidiarrheal activity of dopamine, serotonin and neurokinin receptor antagonists. It was shown, that the most effective drug for prevention of dyspeptic manifestations of the prodromal stage of acute radiation syndrome is blocker of 5-HT₃ receptors palonosetron.

Key words: N-V-D stage of acute radiation syndrome, metoclopramide, ondansetron, palonosetron, aprepitant

Первичная реакция на облучение (ПРО) относится к наиболее ранним клиническим синдромам лучевого поражения организма. Ее развитие, особенно диспепсические нарушения (тошнота, рвота, диарея), являются одной из основных причин ухудшения самочувствия и снижения трудоспособности пострадавших в раннем постлучевом периоде. Так, пороговая доза возникновения рвоты при общем облучении человека составляет около 1 Гр, а латентный период ее появления — от 30 мин до 6 ч и тем короче, чем выше доза облучения [1]. Особую актуальность проблема профилактики и купирования ПРО приобретает в условиях проведения экстренных противоаварийных работ, при ликвидации последствий радиационных аварий, когда личный состав аварийно-спасательных групп и технический персонал объекта,

эксплуатирующего источники ионизирующих излучений (ИИ), может находиться в ситуации непрогнозируемости облучения организма в широком диапазоне доз.

Очевидно, что успешное решение проблемы разработки эффективных средств борьбы с диспепсическим синдромом ПРО во многом зависит от раскрытия патогенетических механизмов, обуславливающих симптоматику желудочно-кишечных расстройств, возникающих в ранние сроки после смертельных радиационных поражений. По существующим представлениям в основе патогенеза ПРО лежат нарушения гомеостаза, обусловленные нервными и гуморальными влияниями на центральную нервную систему со стороны желудочно-кишечного тракта. При этом ведущее значение придается постлучевой токсемии, вызываемой продуктами распада радиочувствительных тканей, аномальными метаболитами и другими биологически активными веществами [2]. Кроме того, определенную роль играет патологическая афферентная импульсация от interoцепторов органов брюшной полости в высшие вегетативные центры [3].

Несмотря на то, что диспепсический синдром ПРО достаточно многообразен, а его проявления сложно купировать с помощью фармакологических средств, разработка средств борьбы с ПРО является одним из наиболее плодотворных в теоретическом плане и продуктивных — в практическом, среди направлений исследований, связанных с созданием медицинских средств противорадиационной защиты. Необходимо отметить, что для борьбы с эметической реакцией предложено много лекарственных средств, относящихся к различным фармакологическим группам (нейролептики, дофаминитики, антагонисты серотониновых рецепторов и др.) [4]. Однако, в настоящее время для борьбы с диспепсическими проявлениями ПРО предназначен только один препарат — Латран (ондансетрон) [5]. В первую очередь это связано с побочными эффектами большинства противорвотных средств, в частности с угнетением центральной нервной системы.

Цель исследования состояла в экспериментальном изучении современных противорвотных препаратов в качестве средств профилактики и купирования диспепсических проявлений (рвота и диарея) ПРО.

Эксперименты проведены на 72 беспородных собаках обоего пола, массой 15–19 кг. Животных подвергали однократному относительно равномерному воздействию гамма-излучения на установке ИГУР-1 (при мощности дозы 1,01 Гр/мин). Собак облучали в абсолютно эметогенных дозах (20 и 30 Гр). После облучения за животными наблюдали в течении 6 ч и отмечали частоту и выраженность диспепсических проявлений.

Исследовали антидиспепсическую активность метоклопрамида (D_2 блокатор), ондансетрона (антагонист $5HT_3$ рецепторов I поколения), палоносетрона (антагонист $5HT_3$ рецепторов II поколения) и апрепитанта (NK_1 блокатор). Препараты вводили через 2-3 мин после окончания облучения перорально или внутримышечно. Дозы препаратов рассчитывали исходя из рекомендованных доз для человека с поправкой на коэффициент межвидового переноса [6]. При проведении исследования соблюдали требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в т.ч. по гуманному отношению к ним [7].

После облучения собак рвота развивалась в 100 % случаев через 25-35 мин после облучения в дозе 20 Гр и через 12-18 мин после облучения в дозе 30 Гр. В обоих случаях наблюдали появление 8-9 актов рвоты, которые повторялись практически без промежутка по 3–4 раза на фоне выраженного угнетения поведения животных. Раннюю диарею у 25–40 % собак каждой группы отмечали в течение первого часа после облучения. Она проявлялась 1–4-х кратной дефекацией жидкими массами с примесью слизи.

Антагонист D_2 рецепторов метоклопрамид способствовал предупреждению рвоты у 40-50 % собак, облученных в дозе 20 Гр, и у 10-20 % животных, облученных в дозе 30 Гр. При этом количество рвотных актов и время их появления у животных с развившейся постлучевой эметической реакцией существенным образом не уменьшались. Введение метоклопрамида не влияло на частоту и характер проявления диареи у облученных собак. Более выраженное противорвотное действие отмечали после введения антагониста 5HT₃ рецепторов I поколения ондансетрона. После его введения купирование рвоты наблюдали у 50-70 % собак, облученных в дозе 20 Гр, и у 40-50 % животных, облученных в дозе 30 Гр. У оставшихся собак начало эметической реакции замедлялось на 30-60 мин, а количество рвотных актов сокращалось в 1,2-2 раза. Отмечено благоприятное влияние ондансетрона на постлучевую диарею. Его введение позволяло полностью предотвратить ее появление. Введение антагониста 5HT₃ рецепторов II поколения палонсетрона оказывало наиболее выраженное влияние на диспепсические проявления ПРО. В случае его введения после воздействия ИИ в дозе 30 Гр единичные рвотные акты развивались у 50-60 % облученных животных через 4-5 ч после окончания облучения, а при облучении в дозе 20 Гр рвотная реакция отсутствовала у 100 % животных. Так же как и при введении ондансетрона, применение палонсетрона полностью предотвращало развитие ранней диареи у облученных собак. Антагонист NK₁ рецепторов апрепитант, относящийся к наиболее «молодой» фармакологической группе противорвотных средств в отношении постлучевой рвоты оказался недостаточно эффективным. Его введение предотвращало эметическую реакцию лишь у 50-60 % собак, облученных в дозе 20 Гр и у 30-40 % животных, облученных в дозе 30 Гр. Его введение позволяло уменьшить количество рвотных актов в поздний период наблюдения, спустя 4-5 ч после облучения. Влияния на диарею апрепитант практически не оказывал.

Представленные материалы свидетельствуют, что для профилактики и купирования диспепсического синдрома ПРО наиболее перспективны антагонисты 5HT₃ рецепторов II поколения. К преимуществам препаратов данной фармакологической группы относятся: небольшие разовые терапевтические дозы (порядка нескольких мг), существенная длительность эффекта (до 24 ч), нейтральная величина pH растворов. Актуальной также остается задача по созданию комплексных рецептур, компоненты которых будут наиболее эффективно воздействовать на различные проявления ПРО (тошноту, рвоту, диарею, гиподинамию).

Список литературы

1. Flynn D.F., Goans R.E. Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties // *Surg. Clin. North Am.* 2006. Vol.86, № 3. P. 601–636.
2. Maranzano E. Radiation-induced emesis: a problem with many open questions // *Tumori.* 2001. Vol. 87, № 4. P. 213–218.
3. Шагоян М.Г., В.И. Легеза, Турлаков Ю.С. Новые направления в фармакотерапии синдрома первичной реакции на облучение // 3 Съезд по радиац. исслед. «Радиобиол., радиоэкол., радиац. безопас.», Москва, 14–17 окт., 1997. Пушино, 1997. Т. 2. – С. 217–218.
4. Jordan K., Gralla R., Jahn F., Molassiotis A. International antiemetic guidelines on chemotherapy induced nausea and vomiting (CINV): content and implementation in daily routine practice // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. Vol. 722. P. 197–202.
5. Гладких В.Д., Баландин Н.В., Башарин В.А. [и др.] Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиаторных поражений / под ред. В.Д. Гладких. М.: «Комментарий», 2017. С.192–197.

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. 832 с.

7. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы. СПб., 2012. 48 с.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ F1 ПОКОЛЕНИЯ МЫШЕЙ,
АДАПТИРОВАННЫХ НЕ-НЕ ЛАЗЕРНЫМ И РЕНТГЕНОВСКИМ
ИЗЛУЧЕНИЯМИ *IN VIVO***

*А.Р. Дюкина¹, С.И. Заичкина¹, О.М. Розанова¹, С.С. Сорокина¹, С.П. Романченко¹,
Е.Н. Смирнова¹, А.Е. Шемяков¹, В.И. Юсупов², В.Н. Баграташвили²*

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
Россия, ² Институт фотонных технологий ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН,
г. Москва, г. Троицк, Россия,
e-mail: dyukina@rambler.ru

Резюме. В результате комплексного исследования первого поколения мышей, предоблученных He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями, было обнаружено по тестам «радиочувствительность» и «радиационный адаптивный ответ», что они отличаются от потомков необлученных самцов при одинаковом уровне спонтанных повреждений. Это позволяет говорить о возможности передачи адаптированного состояния, индуцированного низкими дозами He-Ne лазерного и рентгеновского излучений, от родителей потомкам первого поколения.

Ключевые слова: He-Ne лазерное и рентгеновское излучения, активные формы кислорода, адаптивный ответ, микроядерный тест, асцитная карцинома Эрлиха, потомки, мыши.

**INVESTIGATION OF THE FEATURES OF THE FIRST GENERATION
OFFSPRING OF MICE EXPOSED TO HE-NE LASER AND X-RAY RADIATION IN
VIVO**

*A.R. Dyukina¹, S.I. Zaichkina¹, O.M. Rozanova¹, S.S. Sorokina¹, S.P. Romanchenko¹,
H.N. Smirnova¹, A.E. Shemyakov¹, V.I. Yusupov², V.N. Bagratashvili²*

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia,
²Institute of Phonon Technologies, Research Center "Crystallography and Photonics" of RAS,
Troitsk, Moscow, Russia, e-mail: dyukina@rambler.ru

Summary. As result of the integrated study of the features of the first generation offspring of mice exposed to He-Ne laser and X-ray radiation, it was found that they differ from offspring of unirradiated males by performing "radiosensitivity" and "radiation adaptive response" tests at the same time the level of spontaneous damage was similar. This suggests the possibility of transmission of the adapted state, induced by low doses of He-Ne laser and X-ray radiation, from parents to the offspring of the first generation.

Key words: He-Ne laser and X-rays, reactive oxygen species, adaptive response, micronucleus test, Ehrlich ascites carcinoma, offspring, mice.

Ранее нами было изучено влияние низкоинтенсивного красного и ближнего инфракрасного излучений от светодиодных матриц (650 нм, 30 с; 850 нм, 10 мин), He-Ne лазера (633 нм, 5 с), а также рентгеновского излучения (0.1 Гр, 0.1 Гр/мин) на индукцию цитогенетического адаптивного ответа (АО) в клетках костного мозга мышей *in vivo*. Показано, что при всех исследованных излучениях выявлялся АО, который заключается в индукции малыми дозами изученных агентов устойчивости к последующему выявляющему воздействию больших доз, при этом уровень спонтанных цитогенетических повреждений не изменялся [1]. Явление, когда адаптирующее и выявляющее воздействия являются факторами разной природы, называется перекрестным адаптивным ответом, который может являться важнейшим биологическим резервом естественной защиты организма [2]. В последние десятилетия в медицинской практике появилось много различных приборов, действие которых

основано на использовании неионизирующих низкоинтенсивных электромагнитных излучений. Наиболее часто используется излучения инфракрасного света и He-Ne лазера, которые обладают биостимулирующим действием [3]. Несмотря на широкое применение в клинике, данных о генотоксических эффектах этих излучений с определенными параметрами мало, они противоречивы и не систематизированы по мощности и критериям повреждения. Основным показателем безопасности подобных приборов является оценка генотоксичности, которая определяется с помощью регистрации повреждений в ядерном аппарате клетки (хромосомные аберрации, микроядерный тест, «комета»-тест) и канцерогенного риска. Существующие данные не позволяют говорить об оптимальных эффективных дозах этих излучений для защиты [4]. Изученные нами ранее источники неионизирующих излучений (инфракрасный свет - 850 нм и красный свет He-Ne лазера - 633 нм) при всех дозах не вызывали увеличения естественного спонтанного фона молекулярных и цитогенетических повреждений. Было показано, что индукция АО при предоблучении мышей низкоинтенсивным He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями, зависит от величины адаптирующей дозы, времени между адаптирующей и выявляющей дозами и коррелирует с изменением уровня продукции активных форм кислорода (АФК) [5].

Постоянный интерес исследователей, занимающихся оценкой отдаленных последствий действия малых доз радиации, вызывает феномен генетической нестабильности, который заключается в изменении свойств потомков родителей, подвергшихся различным низкодозовым воздействиям. Важность изучения этого феномена связана с тем, что нестабильность генома запускает такие процессы, как мутагенез, канцерогенез и преждевременное старение потомков. Генетическая нестабильность была показана как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием различных критериев: частоты хромосомных аберраций, точковых мутаций, трансформации и репродуктивной гибели клеток [6]. Тем не менее, к настоящему времени мы располагаем немногочисленными и зачастую противоречивыми данными, полученными на животных, чьи родители подверглись воздействию низких доз ионизирующей радиации, и совсем практически нет данных при действии низкоинтенсивных неионизирующих излучений. Поэтому комплексный подход к исследованию клеточных и организменных реакций у потомков животных, облученных низкоинтенсивным He-Ne лазерным излучением, представляется нам весьма актуальным.

Целью работы было изучение свойств первого поколения мышей, облученных He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями, по тестам «радиочувствительность» и «адаптивный ответ» в цельной крови, костном мозге и лимфоидных органах, скорости роста опухоли и выживаемости.

В экспериментах использовали двухмесячных самцов белых мышей линии SHK. Экспериментальные группы облучали He-Ne лазером (633 нм, 0.16 мВт/см²) 5 с и 100 с или рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (0.1 Гр/мин, 200 кВ, 8 мА, ЦКП «Источники излучения ИБК РАН», Пущино). Группа необлученных животных была взята в качестве контроля. Для получения F1 поколения к облученным самцам через 2 недели подсаживали необлученных самок. Потомство от облученных и необлученных самцов в возрасте 2 мес было подвергнуто облучению в дозе 1.5 Гр для определения радиочувствительности или по схеме индукции радиационного АО (0.1 Гр+1.5 Гр) [7]. Определяли уровни цитогенетических повреждений с помощью микроядерного теста в костном мозге, продукции АФК методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции и индексы масс тимуса и селезенки. Динамику роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и выживаемость мышей при облучении в дозе 6.5 Гр оценивали по стандартным методикам.

В костном мозге с помощью микроядерного теста было обнаружено, что потомки облученных родителей более радиоустойчивы по сравнению с родителями. При облучении их по схеме АО этот феномен отсутствовал как в костном мозге, так и лимфоидных органах в отличие от родителей, при этом величина спонтанного фона была одинаковой.

Поскольку в биологических процессах основную сигнально-регуляторную роль играют АФК, изменение их продукции в организме может влиять на адаптацию к повреждающим воздействиям различных видов излучений. При исследовании уровня продукции АФК в крови потомков мышей, предоблученных He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями, было обнаружено, что фоновое значение индекса активации у облученных потомков в несколько раз выше, чем у контрольных потомков. При облучении всех потомков в дозе 1.5 Гр индекс активации был одинаковым, а по схеме радиационного АО наблюдалось значительное его повышение у потомков облученных родителей, что говорит об активации резервной возможности нейтрофилов.

У потомков предоблученных самцов скорость роста АКЭ была такой же, как у необлученных животных, в отличие от родителей, у которых наблюдалось торможение скорости опухоли. Выживаемость потомков, облученных в дозе 6.5 Гр, была такая же, как у родителей и в контрольной группе.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что F1 поколение мышей от адаптированных He-Ne лазерным и рентгеновским излучениями характеризуется в отличие от родителей повышенной радиоустойчивостью клеток костного мозга и лимфоидных органов, что коррелирует с изменением уровня продукции АФК. Полученные данные свидетельствуют о возможности трансгенерационной передачи адаптированного состояния самцов, индуцированного низкими дозами He-Ne лазерного и рентгеновского излучений.

Список литературы

1. Заичкина С.И., Розанова О.М., Дюкина А.Р. и др. Влияние низкоинтенсивного красного и ближнего инфракрасного излучений на уровень продукции активных форм кислорода, генетический аппарат и скорость роста перевиваемой опухоли у мышей *in vivo*. Биофизика, 2013, Т. 58, № 5, С. 897-903.
2. Wojewodzka M., Kruszewski M., Szumiel I. Effect of signal transduction inhibition in adapted lymphocytes: micronuclei frequency and DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 1997. Vol. 71. P. 245-252.
3. Karu T.I. Ten lectures on basic science of laser phototherapy. - Grangesberg Sweden: Prima Books, 2007. P. 243.
4. Liu Y.H., Ho C.C., Cheng C.C. et al. Fotoradiation Could Influence the Cytoskeleton Organization and Inhibit the Survival of Human Hepatoma Cells *in vitro*. *Lasers Med. Sci.*, 2006. Vol. 21. P. 42-48.
5. Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Розанова О.М., и др. Индукция радиационного адаптивного ответа у мышей при действии гелий-неонового лазера и рентгеновского излучения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016 г., Том 161, № 1, С. 32-35.
6. Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J. et al. Radiation-induced germline instability at minisatellite loci. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, Vol. 74, № 6, 689-696.
7. Заичкина С.И., Клоков Д.Ю., Розанова О.М. и др. Действие малых доз гамма-радиации на цитогенетическое повреждение в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей *in vivo*. Генетика, 1998, Т. 34, № 7. С. 1013-1016.

УЧАСТИЕ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ В ПРОЯВЛЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ РЕДКО- И ПЛОТНОИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Е.С. Евстратова, В.Г. Петин

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия,
e-mail: ekevs7240@mail.ru

Резюме. Для дрожжевых клеток традиционно предполагалось, что генетическая нестабильность в большей степени выражена для диплоидных, а не для гаплоидных дрожжевых клеток. В противоположность данному представлению, в данной работе на дрожжевых клетках различного генотипа показано, что генетическая нестабильность определяется главным образом плоидностью клеток. Показано, что ОБЭ плотноионизирующих излучений, рассчитанное по тестам как выживаемости, так и генетической нестабильности, детерминируется способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений.

Ключевые слова: генетическая нестабильность, ОБЭ, гамма-кванты, альфа-частицы, дрожжевые клетки, выживаемость, восстановление, ЛПЭ излучения.

PARTICIPATION OF RECOVERY PROCESSES IN THE MANIFESTATION OF GENETIC INSTABILITY OF CELLS AFTER ACTION OF DENTISTRYING RADIATIONS

E.S. Evstratova, V.G. Petin

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: ekevs7240@mail.ru

Summary. As it is traditionally assumed, genetic instability is more pronounced for diploid rather than haploid yeast cells. On the contrary, at present work on yeast cells of different genotype it was shown that genetic instability is determined mainly by cell ploidy. It is shown that RBE of densely ionizing radiation both for survival and genetic instability is determined by the ability of cells to recover from radiation damage

Key words: genetic instability, RBE, gamma rays, alpha particles, yeast cells, survival, recovery, LET radiation.

Изучение относительной биологической эффективности (ОБЭ) действия редко- и плотноионизирующих излучений для различных биологических тестов является актуальной проблемой современной радиобиологии [1]. Действительно, половина дозы естественного облучения человека обусловлено излучениями с высокими линейными потерями энергии (ЛПЭ), создаваемыми α -частицами радона и его дочерними продуктами распада. Кроме того, космонавты при длительных полетах подвергаются воздействию плотноионизирующих заряженных частиц. Перспективным является их использование для подавления способности клеток восстанавливаться от сублетальных повреждений, представляющее большую проблему в лучевой терапии.

К проявлениям генетической нестабильности наряду с дестабилизацией хромосом, соматическими мутациями, изменением чувствительности к действию ионизирующих излучений и других вредных факторов относят отсроченную

репродуктивную гибель клеток [2]. Генетическая нестабильность касается таких важных явлений, как радиационный мутагенез, канцерогенез и старение, – главных отдалённых последствий действия ионизирующих излучений [3]. Известно, что эффект позднего формирования колоний выжившими после облучения дрожжевых клеток хорошо выражен для диплоидных клеток, способных к восстановлению двунитевых разрывов ДНК, индуцированных ионизирующим излучением. Наоборот, этот эффект выражен в значительно меньшей степени для гаплоидных клеток, неспособных к пострadiационному восстановлению [4, 5]. Хотя генетическая нестабильность генома известна и после облучения α -частицами [6, 7], малоисследованным аспектом этой проблемы является количественная оценка ОБЭ радиационно-индуцированной генетической нестабильности после действия редко- и плотноионизирующих излучений на гаплоидные и диплоидные клетки. Поэтому целью данной работы является изучение ОБЭ α -частиц для выживаемости и генетической нестабильности, определяемой задержкой формирования колоний выжившими после облучения гаплоидными и диплоидными дрожжевыми клетками различного генотипа.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штаммы S288C (RAD) and XS800 (RAD/RAD); XS774-4d (*rad51*) and XS806 (*rad51/rad51*); g160/2d (*rad52*) and XS1898 (*rad52/rad52*); g218/7c (*rad54*) and XS1879 (*rad54/rad54*). Большинство радиобиологических реакций дрожжевых клеток (форма кривой выживаемости, зависимость ОБЭ от ЛПЭ, кислородный эффект, действие радиопротекторов и радиосенсибилизаторов) качественно являются похожими на реакции культивируемых клеток млекопитающих. В качестве редкоионизирующего излучения использовали γ -кванты ^{60}Co (0.2 кэВ/мкм, 20 Гр/мин), в качестве плотноионизирующего – α -частицы ^{239}Pu (120 кэВ/мкм, 23 Гр/мин). Подсчёт количества макроколоний, сформированных выжившими после облучениями клетками, производили спустя 22 ч и соответственно каждые 2–6 ч до тех пор, пока не прекращалось появление колоний клетками облученной популяции. Последний подсчёт производили после 4-х суточной инкубации. Каждый опыт повторяли 2–5 раз. Выживаемость определялась способностью клеток формировать макроколонии на твердой питательной среде. Генетическую нестабильность оценивали по степени задержки формирования колоний клетками, выжившими после облучения.

Результаты. Показано, что степень генетической нестабильности, определяемая задержкой появления колоний клетками, выжившими после облучения излучениями с различными линейными потерями энергии (ЛПЭ), определяется главным образом плоидностью клеток: как резистентные, так и радиочувствительные диплоидные штаммы в отличие от гаплоидных, демонстрируют значительную задержку появления клонов (100% vs. 20%), выживших после облучения. На этом основании делается вывод, что генетическая нестабильность определяется плоидностью, а не сигмоидной формой кривой выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, как это принято считать для *Saccharomyces cerevisiae* [4, 5]. Если предположить, что выявленная закономерность сохранится на организменном уровне, можно полагать, что генетическая нестабильность будет более выражена для диплоидных соматических клеток, чем для гаплоидных половых клеток.

Впервые проведена количественная оценка эффективности излучений с высокими ЛПЭ для индукции генетической нестабильности. Показано, что ОБЭ α -частиц примерно одинакова при использовании обоих тест-эффектов для гаплоидных (ОБЭ = $2,0 \pm 0,2$) и диплоидных (ОБЭ = $4,2 \pm 0,3$) клеток, но эти значения определяются способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений. Эти результаты известны для выживаемости клеток, но они являются принципиально новыми для генетической нестабильности и указывают на участие процессов

рекомбинационного восстановления клеток в механизме проявления ОБЭ как для выживаемости, так и для генетической нестабильности клеток.

Обсуждение. Получены оригинальные данные, демонстрирующие хорошо выраженную генетическую нестабильность для диплоидных клеток дикого типа и радиочувствительных штаммов с экспоненциальными кривыми выживаемости. Это означает, что эффект позднего появления колоний облученными дрожжевыми клетками не связан однозначно с формой кривой выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, а детерминируется ploidy клеток. Делается вывод, что облученные клетки главным образом диплоидных, а не гаплоидных штаммов, в большей степени наследуют некоторые суб-повреждения, ответственные за проявление генетической нестабильности.

Практически одинаковые значения ОБЭ для выживаемости клеток и генетической нестабильности могут быть связаны с большей эффективностью плотноионизирующей радиации формировать летальные радиационные повреждения и сопутствующие им субповреждения, ответственные за задержку появления колоний клетками, выживающими после облучения. Полученные повреждения сохраняются у отдаленных потомков клеток и тем самым вызывают дестабилизацию генома, что проявляется в задержанном образовании колоний после облучения. Эти результаты могут быть объяснены большей эффективностью излучения с высоким ЛПЭ образовывать кластеры ионизаций и возбуждений в ДНК, которые приводят к более сложным радиационным повреждениям, чем излучение с низкими ЛПЭ.

Список литературы

1. Красавин Е.А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.: Энергоатомиздат. 1989. 192 с.
2. Воробцова И.Е. Трансгенная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома и предрасположенность к канцерогенезу // Вопросы онкологии. 2008. Т. 54, № 4. С. 490-493.
3. Skoneczna A., Kaniak A., Skoneczny M. Genetic instability in budding and fission yeast – sources and mechanisms // FEMS Microbiol. Rev. 2015. Vol. 39. P. 917-67.
4. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат. 1978. 232 с.
5. Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultcevich Yu.G. et al. Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms // Proc. 2-nd Int. N.W. Timofeef-Ressovsky Conference. Dubna. 2007. V. 1. P. 419-447.
6. Kadhim M.A., Lorimore S.A., Hepburn M.D., Goodhead D.T., Buckle V.J., Wright E.G. Alpha-particle-induced chromosomal instability in human bone marrow cells // Lancet 1994. V. 344. P. 987–988.
7. Ponnaiya B., Jenkins-Baker G., Bigelow A., Marino S., Geard C.R. Detection of chromosomal instability in α -irradiated and bystander human fibroblasts // Mutat. Res. 2004. Vol. 568. P. 41-48.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОБШИРНЫХ ТЕРМИЧЕСКИХ РАН, ОСЛОЖНЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ, В ТОМ ЧИСЛЕ, ВЫЗВАННЫХ РАДИАЦИОННЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ

Т.С.Егорова, А.М.Шляков, И.В. Чурилова, Н.В.Конторина, Л.А.Прокофьева

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия,

e-mail: egorova@hpb-spb.com

Резюме: Лучевая болезнь – это ожоговое поражение организма, возникающее под влиянием различных видов радиоактивных лучей. Разработаны противоожоговые аэрозольные препараты в форме спреев на основе мицеллярно-гелевых множественных наноэмульсий, включающие в состав - интерлейкин-1 β , супероксиддисмутазу (СОД) и нанокластеры нульвалентного серебра. Показана эффективность разработанных препаратов для лечения ожоговых ран на модели контактного термического ожога у мышей, осложненного бактериальной инфекцией.

Ключевые слова: ожоги, спрей, нанокластерное серебро, интерлейкин-1 β , супероксиддисмутазы

DEVELOPMENT OF DRUGS FOR THERAPY OF VAST THERMAL INJURIES OF DIFFERENT ETIOLOGY, COMPLICATED BY BACTERIAL INFECTIONS, INCLUDING THOSE CAUSED BY RADIATION DAMAGE

T.S.Egorova, A.V.Shlyakov, I.V. Churilova, N.V.Kontorina, L.A.Prokofieva

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg,

e-mail: egorova@hpb-spb.com

Summary. Radiation sickness is a radiation injury of organism arising under the influence of various types of radiation. Aerosol formulations in a form of spray based on micellar gel multiple nanoemulsions were developed. They include interleukin-1 β , superoxide dismutase (SOD) and zerovalent silver nanoclusters. The efficacy of the drugs for treating thermal burns was shown in mouse model of contact thermal burns complicated with bacterial infection.

Key words: burns, spray, silver nanocluster, interleukin-1 β , superoxide dismutase

Ожог – это открытое повреждение кожи и ее придатков, слизистых оболочек, других тканей, вызванное действием высокой температуры, электрического тока, радиации, агрессивных химических соединений (кислоты, щелочи) или их комбинацией. Лучевые ожоги возникают при ведении боевых действий с применением ядерного вооружения, техногенных авариях на атомных электростанциях и научно-исследовательских реакторах.

Несмотря на успехи, достигнутые в местном лечении ожоговых ран, и большое количество применяемых ранозаживляющих препаратов и материалов, сохраняется необходимость в постоянном совершенствовании их качества и разработке новых методологических подходов для лечения ожоговых поражений. Самостоятельное значение в практике лечения ожогов приобрели лекарственные формы в виде аэрозолей и спреев (крупнокапельный аэрозоль), обеспечивающие быстроту и равномерность нанесения активного препарата на раневую поверхность и возможность оказания помощи в максимально ранние сроки после получения травмы пациентом, что особенно актуально при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций.

В настоящее время не вызывает сомнения то, что после любой травмы, особенно ожоговой, возникает иммунодефицитное состояние, которое в значительной степени обуславливает развитие инфекционных процессов [1]. Нередко дисфункция иммунной системы сопровождается резким замедлением регенерации ожоговых ран [2, 3].

Разработанные аэрозольные препараты предназначены для терапии обширных ожогов и других поражений кожи, осложненных бактериальными и вирусными инфекциями. Их состав обеспечивает как местное, так и системное воздействие на раневую процесс, с учетом характера и стадии его течения; правильный выбор основы позволяет корректировать локальные нарушения жидкостного баланса в области поражения; форма в виде спрея исключает травматическое воздействие на поврежденные кожные покровы пациента, проста и удобна в применении и позволяет использовать в случаях, когда применение других препаративных форм затруднительно или невозможно (например, при лечении обширных ожоговых поражений кожного покрова). В качестве аэрозольного устройства был выбран флакон-спрей «СИМ-20 СПРЕЙ» производства ООО «Меридиан», Санкт-Петербург, Россия. Использование данного устройства обеспечивало получение крупнокапельного аэрозоля (спрея) препаратов и точное их дозирование.

Цель работы - разработка составов и технологии получения аэрозольных препаратов «АэроКин1» и «АэроКин-2» на основе мицеллярно-гелевых композиций, включающие следующие активные компоненты: интерлейкин-1 β (IL-1 β) - стимулятор регенерации тканей, супероксиддисмутаза (СОД) - фермент, обладающий противовоспалительной активностью и нанокластеры нульвалентного серебра, обеспечивающие противомикробные и противовирусные свойства препаратов. В состав препарата «АэроКин1» входят: вспомогательные вещества; СОД; нанокластерное нульвалентное серебра, стабилизированное мицеллами; вода. В состав препарата «АэроКин2» входят: вспомогательные вещества; интерлейкина-1 β ; нанокластерное нульвалентное серебра, стабилизированное мицеллами; вода.

Предлагаемая форма разработанных препаратов в виде спрея удобна в применении, позволяет уменьшить травматическое воздействие на ожоговую поверхность и облегчает очищение раны и удаление поврежденных тканей током экссудата, приобретающего характер гноя. Количество гнойного экссудата в ране, которая заживает в естественном темпе, со временем уменьшается. Нельзя допускать распространения гнойного экссудата на здоровые ткани. Для этого обычная перевязка превращается в мини-операцию – из раны при каждой обработке необходимо удалить скопившийся гной. Образование тонкой пленки после нанесения препаратов позволит обходиться без дополнительного использования перевязочного материала.

При лечении животных аэрозольными препаратами «АэроКин 1» и «АэроКин 2» были использованы две схемы лечения:

- схема 1 - животные получала препарат «АэроКин 1» на первой фазе раневого процесса (в течение 8 дней), затем раны обрабатывали аэрозодем препарата «АэроКин 2»;
- схема 2 - животных первые два дня лечения получала препарат «АэроКин 2», затем раны обрабатывали аэрозодем препарата «АэроКин 1».

В качестве контрольной группы использовали животных с ожоговой травмой, не получавших лечения.

Показано, что у животных, которых лечили аэрозольными препаратами «АэроКин 1» и «АэроКин 2» уменьшение площади ожоговых ран проходило с большей скоростью. Время заживления раны у животных контрольной группы составляло более двух недель, для опытных групп процесс заживления завершался быстрее. Для группы животных, получавших лечение по схеме 1 - на 12-13 сутки, для

группы животных, получавших лечение по второй схеме на 11-12 сутки. Начиная с 6-х суток от момента лечения, различия в скорости заживления ран между экспериментальными группами были статистически значимы. Схема 1 позволила сократить сроки лечения животных на 2 суток.

Список литературы

1. Бялик Е.И. Ранний остеосинтез переломов костей конечностей при сочетанной травме: дис. д-ра мед. наук.// Биомедицинский журнал. 2002. Vol. 84, № 8., с.1093-1110.
2. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения) / СПб.: ЭЛБИ, 2003. 128 с.
3. Park J.O., Shin S.D., Kim J. et al. Association between socioeconomic status and burn injury severity // Burns. 2009. Vol. 35(4). P. 482-490.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN VITRO И IN VIVO

Ермакова О.В., Велегжанинов И.О., Ермакова А.В., Раскоша О.В.

ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия,

e-mail: ermakova@ib.komisc.ru

Резюме. Показано, что хроническое низкоинтенсивное ионизирующее излучение (ИИ) вызывает усиление пролиферации тироцитов щитовидной железы мышевидных грызунов, а однократное облучение эмбриональных фибробластов человека в дозе 3-5сГр вызывает ускорение пролиферации их потомков через несколько удвоений, причем наблюдаемая стимуляция пролиферации не только не приводит к более быстрому истощению пролиферативного потенциала клеток, но наоборот, замедляет накопление стареющих фибробластов в культуре

Ключевые слова: малые дозы, низкоинтенсивное ионизирующее излучение, мышевидные грызуны, тироциты, пролиферация, фибробласты в культуре

INFLUENCE OF LOW DOSE OF IONIZING RADIATION ON THE PROLIFERATION OF MAMMALS CELLS IN VITRO AND IN VIVO

Ermakova O.V., Velegzhaninov I.O., Ermakova A.V., Raskosha O.V.

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktывkar, Russia, e-mail: ermakova@ib.komisc.ru

Summary. In the present work was shown that chronic low dose rate γ -radiation causes increasing of proliferation of thyroid gland of mouse-like rodents both under natural conditions and under experimental conditions. In vitro experiments showed that a single irradiation of human embryonic lung fibroblasts at 3-5 cGy causes an acceleration of the proliferation of their descendants after several doubling. The observed stimulation of proliferation not only does not lead to a more rapid depletion of the proliferative potential of fibroblasts, but on the contrary, slows down the accumulation of aging cells in culture.

Key words: low doses, low dose rate radiation, mouse rodents, thyrocytes, proliferation, human fibroblasts

Для поддержания и сохранения гомеостаза организма необходимы жесткие системы регуляции процессов, протекающих не только в целом организме, но и на клеточном и молекулярном уровнях. Так, чтобы избежать формирования злокачественных новообразований, в каждой делящейся клетке организма выработались механизмы, контролирующие ее деление. Хорошо известно деструктивное действие ИИ в высоких дозах на биологические системы. Беспорядочная ионизация вещества приводит к повреждению макромолекул, нарушению их функции, и как следствие к нарушению функции систем на вышестоящих уровнях организации живой материи. Одним из хорошо изученных эффектов ИИ в высоких дозах является остановка клеточного цикла, которая, в случае значительных повреждений, не поддающихся репарации, может стать перманентной, что приводит к переходу клетки в состояние преждевременного, стресс-индуцированного клеточного старения [1]. Другими словами, ИИ в высоких дозах подавляет пролиферацию клеток. В то же время, существуют экспериментальные свидетельства того, что эффекты малых доз радиации, не описываются путём простой количественной экстраполяции с области высоких доз [2]. Многие техногенные факторы, и в том числе ИИ, способны индуцировать развитие компенсаторных и патологических изменений в различных тканях, связанные с

повреждением ДНК, апоптозом, остановкой клеточного цикла и изменением скорости пролиферации клеток.

С целью установления возможного влияния радиационного фактора на активность морфогенетических процессов в щитовидной железе (ЩЖ) нами проведено изучение состояния тиреоидной паренхимы мышевидных грызунов после радиационных воздействий. Оценено гистоморфологическое состояние железы, проанализирован спектр распределения фолликулов по диаметру, определена частота индукции микроядер в тироцитах. Обнаружено, что обитание полевок в течение многих поколений в условиях повышенного уровня естественной радиоактивности (50-2000 мкР/ч) вызывает наряду с деструктивными перестройками ткани (разрушение тироцитов, пикноз ядер, появление микроядер) реакции компенсаторно-приспособительного характера, выражающиеся в разрастании фолликулярного эпителия, увеличении количества мелких фолликулов, повышении объемной плотности фолликулярных клеток, которые свидетельствуют об усилении пролиферативных процессов. Данные, полученные в природных условиях, подтверждены экспериментальными исследованиями (25 полевок, 24 мыши линии СВА, 16 крыс линии Вистар) после хронического воздействия внешнего γ -излучения (5-50 сГр). Оказалось, что спектр распределения фолликулов по диаметру сечения в ЩЖ облученных животных демонстрирует универсальную закономерность: по сравнению с необлученными животными наблюдается отчетливый рост (в 1,3 – 1,7 раза) содержания мелких фолликулов. Подобный феномен воспроизведен в модельных опытах (регенерация ЩЖ крыс после гемитироидэктомии). Кроме того, в экспериментах на мышцах линии SHK (80 особей), облученных в дозах – 31; 37; 45 и 52 сГр проанализирован уровень двунитевых разрывов ДНК в тироцитах наряду с изменением способности этих клеток к репарации. При заправке крыс растворимыми соединениями урана (в концентрации 66,6 мг/л в течение 14 месяцев). морфологические изменения ЩЖ носили преимущественно воспалительный характер с формированием очагов клеточной пролиферации [3]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что хроническое низкоинтенсивное облучение в дозе 31 сГр приводит к повышению уровня ДР ДНК и стимуляции пролиферации, в то время как облучение в более высоких дозах не вызывает подобных эффектов. По результатам более ранних исследований, у полевок, отловленных в 30-километровой зоне аварии на ЧАЭС в 1986г., была обнаружена микрофолликулярная структура железы (объемная плотность эпителия достигала 80%, коллоида – всего 7-10%), регенерация ЩЖ осуществлялась вследствие обновления фолликулов и пролиферации железистых клеток. Разрушение и образование новых фолликулов наблюдалось по всему органу, что свидетельствует о мозаичном типе регенерации. Т.о. в ответ на воздействие хронического низкоинтенсивного ИИ наблюдается усиление пролиферации фолликулярного эпителия ЩЖ, как в природных, так и в экспериментальных условиях, что проявляется в возрастании количества активно функционирующих тироцитов, явлении гиперплазии эпителия, сопровождающегося генотоксическими эффектами в виде увеличения числа микроядер [4,5]. Наблюдаемое усиление процессов фолликулогенеза, повышенный пролиферативный потенциал ЩЖ может быть расценен как неспецифическая адаптивная реакция органа на радиоиндуцированное повреждение железистых клеток.

Облучение в малых дозах, как острое, так и хроническое, по сведениям, имеющимся в литературе, может активировать сигнальные каскады MAPK/ERK и PI3K/AKT/mTOR, приводя к стимуляции пролиферации клеток. Ранее нами было показано, что однократное облучение молодой культуры нормальных фибробластов человека, в дозах менее 10 сГр приводит к замедлению скорости клеточного старения, проявляющемуся в более медленном накоплении клеток в фазе G₀, и, соответственно,

более длительном сохранении способности к пролиферации [6]. Эффект радиационно-индуцированной стимуляции пролиферации клеток различных тканей млекопитающих в наших исследованиях и экспериментах других авторов [7] *in vivo* и *in vitro* при малых дозах во многом может быть основой обнаруженного нами эффекта замедления клеточного старения. Очевидно, что стимуляция пролиферации, и в то же время более позднее вступление клеток в необратимую остановку цикла говорит о повышении пролиферативного потенциала. Мы попытались выявить дозовую зависимость обнаруженного эффекта на культуре клеток. Клетки линии ФЛЭЧ-104 на 22-24 пассаже облучали в дозах 0, 1, 3, 5, 9, 12, 15, 20, 50, 100 и 200 сГр от источника Со60 при мощности 1 сГр/с. Через 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51 и 58 дней после облучения оценивали уровень клеточного старения культуры путем гистохимического окрашивания специфическим субстратом β -галактозидазы X-Gal. Максимальное запаздывание в накоплении стареющих клеток относительно контрольной культуры наблюдалось после облучения в дозах 3 и 5 сГр в период с 30 до 51 дня после облучения. Облучение в высоких дозах наоборот вызывало значительное повышение доли стареющих клеток в первые недели после облучения. Данный эффект хорошо известен из литературы и связан с массовым переходом сильно повреждённых клеток в необратимую стресс-индуцированную остановку клеточного цикла [1]. В связи с этим одним из механизмов радиационно-индуцированного увеличения пролиферативного потенциала может быть снижение частоты стресс-индуцированного преждевременного клеточного старения. Кроме того, наблюдаемая стимуляция пролиферации не только не приводит к более быстрому истощению пролиферативного потенциала клеток, но наоборот, замедляет накопление стареющих фибробластов в культуре. Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкоинтенсивное облучение в малых дозах приводит к повышению стимуляции пролиферации, в то время как облучение в более высоких дозах не вызывает подобного эффекта.

Список литературы

1. Day RM, Snow AL, Panganiban RA. Radiation-induced accelerated senescence: a fate worse than death? // *Cell Cycle*. 2014. Vol.13, № 13. P.2011-2012.
2. Velegzhaninov IO, Shadrin DM, Pylina YI, Ermakova AV, Shostal OA, Belykh ES, Kaneva AV, Ermakova OV, Klovov DY. Differential Molecular Stress Responses to Low Compared to High Doses of Ionizing Radiation in Normal Human Fibroblasts // *Dose Response*. 2015. Vol.13, № 1 pii: dose-response.14-058.Velegzhaninov.
3. Маленченко А.Ф., Ермакова О.В., Раскоша О.В. Биологические эффекты воздействия действия урана на щитовидную железу // *Астраханский Медицинский журнал*. 2012. Т.7, № 4. С. 132-134.
4. Ermakova O. V. Comparative Morphological Analysis of Peripheral Endocrine Glands of Small Mammals Inhabiting Areas with High Levels of Radioactivity and Exposed to Chronic Irradiation in Model Experiments // *Biophysics*. 2011. Vol. 56, № 1. P. 135–139
- 5 Павлов А. В., Ермакова О. В., Кораблева Т. Н., Раскоша О. В. Морфометрический анализ фолликулярной структуры щитовидной железы при хроническом γ -облучении в малых дозах // *Морфология*. 2013. Т. 143, № 2. С. 43–46.
6. Ermakova A.V., Velegzhaninov I.O. Low-Dose Irradiation of Human Fibroblasts Leads to Delayed Acceleration of Proliferation of Their Progeny//*Biophysics*. 2017. Vol. 62, №. 5. P 764-768.
7. Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells // *Cancer Res*. 2001.Vol 61, №14. P. 5396-5401.

ВЛИЯНИЕ ПЛОЩАДИ ОБЛУЧАЕМОЙ ПОВЕРХНОСТИ ТЕЛА ПРИ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

Ю. И. Ефремова¹, З. Шинкорова², А. Лиэрова², М. Еличова², Л. Навратил¹

¹Факультет биомедицинской инженерии, Чешский технический университет в Праге, г. Кладно, Чешская республика, ²Факультет военного здравоохранения, Университет обороны, г. Градец Кралове, Чешская республика, e-mail: efremyul@fbmi.cvut.cz

Резюме. В экспериментах на мышах было изучено влияние терапевтического лазера с длиной волны 940 нм на количество лейкоцитов и их популяций в периферической крови на 12-ый день после облучения ионизирующим излучением. Группы отличались величиной облучаемой лазером поверхности тела. Было показано, что облучение меньшей площади поверхности тела мыши было менее эффективным по сравнению с группой, в которой была облучена большая поверхность тела, что может быть связано с недостаточным лазерным облучением органов, обеспечивающих экстрамедуллярный гемопоэз.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, лазер, лейкоциты, клетки крови

INFLUENCE OF AREA OF IRRADIATED BODY SURFACE LASER THERAPY OF GAMMA-IRRADIATED MICE

Yu. Efremova¹, Z. Sinkorova², A. Lierova², M. Jelicova², L. Navratil¹

¹Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Kladno, Czech Republic, ²Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Hradec Kralove, Czech Republic, e-mail: efremyul@fbmi.cvut.cz

Summary. In experiments on mice, the effect of a therapeutic laser with a wavelength of 940 nm on the number of leukocytes and their populations after irradiation with ionizing radiation was studied. Leucocytes and their populations were calculated in the peripheral blood on the 12th day after the ionizing irradiation. The groups were differed in size of the body surface area irradiated by the laser light. It was shown that irradiation of a smaller area of the body surface of the mice was less effective, which may be due to insufficient laser irradiation of organs providing extramedullary hematopoiesis.

Key words: ionizing radiation, laser, leukocytes, blood cells

В настоящее время становится все более актуальной проблематика безопасности жизнедеятельности людей, которые могут быть облучены ионизирующим излучением, например, в результате своей профессиональной деятельности. В экспериментах ученых показано положительное влияние излучения терапевтического лазера на снижение последствий радиационного воздействия ионизирующего излучения [1 - 5]. В наших предыдущих экспериментах [2] был изучен терапевтический лазер с длиной волны 940 нм. Мыши, облученные летальной дозой гамма излучения и лазерным светом (940 нм, 33 Дж, 20 Гц, площадь облученной поверхности 11 см²) имели лучшие показатели выживаемости и большее количество лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и базофилов по сравнению с группой мышей, облученных только гамма излучением ($p < 0,05$). Воздействие на мышей большей лазерной энергии (132 и 200 Дж) не было эффективным.

Цель: Целью эксперимента было исследовать влияние площади облучаемой поверхности тела при лазерной терапии гамма-облученных мышей на количество

лейкоцитов и их популяций на 12-ый день после облучения ионизирующим излучением.

Материалы и методы: Эксперимент проводился на мышах C57BL/6NCr1. Мыши были случайным образом разделены до 3 групп. В группе 1 были мыши облучены только ионизирующим излучением. В группе 2 и 3 были мыши облучены комбинацией ионизирующего и неионизирующего излучения с интервалом 24 часа. В эксперименте были использованы те же параметры гамма (8,4 Гр, общее облучение) и лазерного излучения (940 нм, 33 Дж, 20 Гц), что и в предыдущем эксперименте. Группа 2 и 3 отличались между собой площадью облученной лазером поверхности (11 см² в группе 2 и 6 см² в группе 3). Воздействие лазером производилось на переднюю торакальную и абдоминальную поверхность тела мыши. Сравнилось количество лейкоцитов и их популяций в периферической крови на 12-ый день после облучения ионизирующим излучением. Для статистической обработки данных был использован тест Колмагорова-Смирнова и t-тест Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты: После статистической обработки данных были получены следующие результаты. Количество лейкоцитов и лимфоцитов в группе 2 было в 2 раза меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Количество всех исследуемых клеток крови в группе 3 было больше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Облучение меньшей площади поверхности тела мыши (группа 2) было менее эффективным по сравнению с группой 3, в которой было облучено 11 см² поверхности тела. Количество лейкоцитов и их популяций в периферической крови было в 3,1 – 4,5 раза больше (эозинофилов в 16 раз больше) в организме мышей с большей площадью облученной лазером поверхности тела ($p < 0,05$).

Обсуждение: В организме мышей большую роль при гематопоезе играют органы экстремедуллярного гемопоэза (главным образом селезенка) [6]. Селезенка мышей из группы 2 не была облучена лазерным светом, что могло отразиться на результатах эксперимента. Также была облучена меньшая площадь поверхности ребер, в которых находится красный костный мозг и происходит образование всех типов клеток крови.

Выводы: Меньшая площадь облучаемой лазером поверхности тела может влиять на количество лейкоцитов и их популяций на 12-ый день после облучения ионизирующим излучением. Результаты могут быть связаны с недостаточным лазерным облучением органов, обеспечивающих экстремедуллярный и медуллярный гемопоэз, что будет подробнее исследовано в будущих экспериментах.

Список литературы

1. Djavid G. [et al.] Analysis of Radiomodulatory Effect of Low-Level Laser Irradiation by Clonogenic Survival Assay // *Photomed Laser Surg.* 2015. Vol. 33, №9. P. 452 - 459.
2. Efremova Yu. [et al.] Protective effect of 940 nm laser on gamma-irradiated mice // *Photomed Laser Surg.* 2015. Vol. 33, №2. P. 82 – 91.
3. Morcos N. [et al.] Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats // *Photochemistry and Photobiology.* 2015. Vol. 91, № 4. P. 942 - 951.
4. Ramos Silva C. [et al.] Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure // *Journal of Biophotonics.* 2016. Vol. 9, № 11-12. P. 1157 - 1166.
5. Zalesskaja G. A. [et al.] Combined Impact of Gamma and Laser Radiation on Peripheral Blood of Rats in vivo // *Journal of Applied Spectroscopy.* 2017. Vol. 84, №5. P. 796 – 803.
6. The laboratory mouse / ed. by Hedrich H. [et al.]. London: Elsevier, 2012. 868 P.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИЗОМИТИНА – ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ АНТИОКСИДАНТА НОВОГО ТИПА

Е. Б. Жаковко, И. И. Красильников

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: ezhakovko@yandex.ru

Резюме. Официальный лекарственный препарат визомитин на основе митохондриального антиоксиданта был изучен в качестве радиопротектора. В опытах на крысах при сублетальной (4 Гр) дозе γ -облучения препарат снижал частоту образования индуцированных радиационным воздействием хромосомных aberrаций.

В экспериментах на мышах, подвергнутых летальному ($SD_{80-90/30}$) γ -облучению, визомитин проявил радиосенсибилизирующую активность, снижая 30-суточную выживаемость животных и сокращая их среднюю продолжительность жизни. Двойственный эффект визомитина, затрудняющий его применение в качестве радиопротектора, может быть связан с наличием в молекуле антиоксиданта хиноидной группы.

Ключевые слова: митохондриальный антиоксидант, радиозащитный и радиосенсибилизирующий эффекты, хиноидная структура

EXPERIMENTAL EVALUATION OF RADIOPROTECTIVE EFFICACY OF VIZOMITIN, DRUG PREPARATION BASED AN INNOVATIVE ANTIOXIDANT

Zhakovko E.B., Krasilnikov I.I.

State scientific-research test institute of Military medicine of Department of defense, Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Summary : Officinal drug preparation Vizomitin based on a mitochondrial antioxidant was evaluated as a radioprotective agent. At sublethal γ -exposure (4 Gy), the drug reduced the production frequency of radiation-induced chromosome aberrations in rats.

In mice exposed to lethal γ -radiation ($LD_{80-90/30}$), Vizomitin showed radiosensitising activity, reducing 1 month-survival rate of animals and decreasing their mean lifetime. Dual effect of Vizomitin that hinders its use as a radioprotector, can be ascribed to the presence of a quinoid structure in the molecule of antioxidant.

Key words: mitochondrial antioxidant, radioprotective and radiosensitising effects, quinoid structure

В настоящее время явление, обозначаемое термином «оксидативный стресс», большинство радиобиологов продолжает рассматривать в числе важнейших звеньев патогенеза лучевого поражения организма. Поэтому природные и синтетические антиоксиданты остаются в списке наиболее широко изучаемых радиозащитных средств различного целевого назначения [1]. Между тем, природные антиоксиданты, обладающие хорошей переносимостью и низкой токсичностью, обычно достаточно эффективны лишь при дозах облучения, не превышающих SD_{40-50} . Синтетические антиоксиданты обладают более высокой эффективностью, но при применении в радиозащитных дозах оказывают побочное действие.

В последние годы получило развитие новое направление в разработке радиозащитных средств из числа антиоксидантов. Исследования были направлены на

получение так называемых «таргетных» («мишенных») форм антиоксидантов, обладающих избирательным действием на определенные биологические мишени.

В первую очередь были изучены лекарственные формы антиоксидантов, обеспечивающие направленную доставку вещества непосредственно в клеточные митохондрии, поскольку при облучении именно митохондрии являются основными очагами образования активных форм кислорода, окисляющих митохондриальные белки, липиды и нуклеиновые кислоты.

Успехи в этой области в значительной мере были предопределены синтезом так называемого «иона Скулачева» - катиона тетрафенилфосфония, к которому для лучшей проницаемости через биологические мембраны затем был присоединен деканильный гидрофобный «хвост», связанный с антиоксидантной группой. Предполагалось также, что фосфониевая группа является поставщиком фосфора, участвующего в нейтрализации избытка свободного Ca^{2+} , инициирующего цепные реакции апоптоза, причем увеличение содержания внутриклеточного кальция и продукция активных форм кислорода могут быть взаимосвязанными процессами [2].

Митохондриальные антиоксиданты даже получили название «суперантиоксиданты», поскольку их эффект может проявляться в чрезвычайно малых концентрациях [3].

Нами была изучена радиозащитная эффективность препарата «Визомитин» производства ЗАО «Фрамон» (г. Москва), Препарат выпускается в лекарственной форме «глазные капли» и содержит активное вещество пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромид (ПДТФ) [4] в концентрации 0,155 мкг/мл.

Для оценки радиозащитных свойств визомитина были выполнены 2 серии экспериментов. В первой серии изучали влияние препарата на частоту образования радиационно индуцированных хромосомных aberrаций в клетках костного мозга облученных животных. Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 200-250г. Животных подвергали общему равномерному γ -облучению в дозе 4 Гр (мощность дозы 1,0 Гр/мин), которая является сублетальной для животных данного вида. Визомитин вводили внутрибрюшинно в дозе 0,155 мкг/кг за 30 минут до радиационного воздействия. Приготовление препаратов костного мозга осуществляли по методу [5] в модификации [6].

В результате экспериментов получены данные о том, что введение визомитина за 30 минут до облучения уменьшало его мутагенное действие – частота образования клеток с хромосомными aberrациями снизилась с 20,75% в контроле до 12,75%. Введение визомитина после облучения было менее эффективным – этот показатель уменьшился до 15%. Таким образом, визомитин при профилактическом применении отчетливо уменьшал генотоксическое действие острого γ -облучения.

Во второй серии опытов изучали влияние профилактического введения визомитина на 30-суточную выживаемость животных, подвергнутых острому равномерному γ -облучению в дозах 6,5 или 6,8 Гр ($\text{СД}_{80-90/30}$). Эксперименты проведены на белых беспородных мышьях-самцах массой 18-20 г.

Препарат вводили внутрибрюшинно в дозе 1,5 мкг/кг за 10-15 минут до облучения.

В указанной дозе визомитин не оказывал общетоксического и местнораздражающего действия на необлученных животных.

Опыты показали, что по критерию 30-суточной выживаемости визомитин оказался неэффективным как радиопротектор. Более того, в ряде случаев была отмечена тенденция к радиосенсибилизирующему действию препарата - уменьшению выживаемости или сокращению средней продолжительности жизни.

Полученные результаты можно объяснить присутствием в молекуле визомитина хиноидной группы, которая, как известно, определяет радиосенсибилизирующие свойства ряда известных веществ. Например, лекарственный препарат викасол, содержащий в своей молекуле аналогичную группу, был использован в качестве радиосенсибилизатора при лучевой терапии онкологических заболеваний [7].

Можно предполагать, что радиозащитное действие при летальном облучении покажут таргетные антиоксиданты, аналогичные по структуре ПДФ, но содержащие фрагменты классических антиоксидантов, например, витамина Е.

Дальнейшее изучение противолучевой эффективности таких соединений представляется вполне целесообразным.

Список литературы

1. Ertekin M.V., Sezen O. Radioprotective effects of antioxidants/In: Leaving Edge Antioxidants Research//Harold V. Panglossi, Nova Science Publishers, Inc., 2007, P. 89-144
2. Козлов А.Е., Наумов А.Д. Взаимосвязанное увеличение внутриклеточного кальция и продукции активных форм кислорода как неспецифическая реакция клеток на радиационное поражение //Тез. докл. Междунар. Конф. «Медико-биологические проблемы действия радиации». М., 10-11 апр. 2012 г. М., ФГУ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2012, С. 53.
3. Zabbarova I., Kanai A. Targeted delivery of radioprotective agents to mitochondria//Mol. Interv., 2008, Vol. 8, P. 294-302.
4. Терешкина О.И., Петрыкина Е.А., Федоркин О.Н. [и др.]. Исследования по разработке состава и стандартизации инновационного лекарственного средства «Пластомитин» //Вопр.биол., мед. и фармацевтич. химии, 2017. Т. 20, № 2, С. 19-24.
5. Ford C. E., Hamerton J. L Chromosomes of five rodent species /Nature.1956. — Vol. 32. — P. 247-254.
6. Рац. предл. № 11773 от 06 ноября 2009. Способ забора красного костного мозга из большеберцовой и бедренной кости мелких лабораторных животных / Жаковко Е. Б., Пикалова Л. В. // Воен.-мед. акад. — 7 с.
7. Араев А.К., Баишева С. Предварительные данные по применению викасола в качестве радиосенсибилизирующего средства при лучевой терапии злокачественных опухолей. В сб.: Вопр. экспер. и клинич. рентгенорадиологии. Л., ЦНИРРИ МЗ СССР, 1996. С. 94-95.

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ДЕЙСТВИЮ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НИКЛОЗАМИДА

А.С. Журник, Ю.П. Сёмочкина, Е.Ю. Москалёва

ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия, e-mail: as.zhirnik@mail.ru

Резюме. С использованием клеток карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR и аденокарциномы прямой кишки линии SW837 исследована радиосенсибилизирующая активность никлозамида. Показано, что данный препарат повышает чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения *in vitro*, что отчасти обусловлено ингибированием сигнального пути Wnt/ β -катенин.

Ключевые слова: колоректальный рак, гамма-излучение, лучевая терапия, радиосенсибилизаторы, никлозамид, β -катенин

NICLOSAMIDE ENHANCES THE SENSITIVITY OF HUMAN CANCER CELLS TO GAMMA IRRADIATION

A.S. Zhirnik, Y.P. Semochkina, E.Y. Moskaleva

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia, e-mail: as.zhirnik@mail.ru

Summary. Radiosensitizing activity of niclosamide against COLO 320 HSR human sigmoid colon carcinoma cell line and SW837 human rectal adenocarcinoma cell line was investigated. Niclosamide was shown to increase the sensitivity of cancer cells to ionizing radiation *in vitro*, which may be partially mediated by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: colorectal cancer, gamma radiation, radiotherapy, radiosensibilizers, niclosamide, β -catenin

Одним из наиболее успешных методов лечения онкологических заболеваний является лучевая терапия, эффективность которой может быть недостаточной из-за высокой радиоустойчивости опухолевых клеток. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых малотоксичных радиосенсибилизаторов, способных повышать чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения (ИИ). Ранее было показано, что антигельминтный препарат никлозамид обладает противоопухолевым действием [1], а также радиосенсибилизирующей активностью [2-5]. Установлено, что в клетках рака лёгкого сенсбилизация обусловлена повышением активности молекулярного каскада p38 MAPK/c-Jun и ингибированием активности молекулярных каскадов JAK2/STAT3 и HIF-1 α /VEGF, а в клетках тройного негативного рака молочной железы ингибированием сигнального пути Wnt/ β -катенин [4]. Ранее нами была показана высокая чувствительность клеток колоректального рака человека к никлозамиду [6].

Целью работы является исследование радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR и аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 *in vitro*.

Материалы и методы. Клетки линий COLO 320 HSR и SW837 культивировали в полной культуральной среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота и 50 мкг/мл гентамицина. Для определения радиочувствительности опухолевые клетки подвергали действию γ -излучения (^{60}Co ; 0,75 Гр/мин; $t_{\text{комн}}^{\circ}$) в дозах 1, 2, 4, 6, 8 Гр (установка «ГУТ-200М» НИЦ «Курчатовский институт»). Выживаемость клеток линий COLO 320 HSR и SW837 определяли по количеству живых клеток в

контрольных и опытных пробах через 7 суток после облучения с помощью камеры Горяева после окрашивания трипановым синим. Колониеобразующую активность клеток линии SW837 определяли через 14 суток после облучения с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Полученные данные использовали для построения кривых «доза-эффект». Для анализа радиосенсибилизирующего действия никлозамида опухолевые клетки инкубировали в течение 4 или 24 часов с препаратом в концентрации 2 мкМ, после чего подвергали действию γ -излучения в дозе 2 Гр; культуральную среду заменяли в течение часа после облучения. Активность сигнального пути Wnt/ β -катенин в опухолевых клетках после их инкубации с никлозамидом в течение 4 часов, облучения в дозе 2 Гр и дальнейшей инкубации в течение 24 часов оценивали по общему уровню β -катенина, содержание которого в клетках определяли с помощью проточной цитофлуориметрии после окрашивания клеток соответствующими антителами.

Результаты. Охарактеризована чувствительность клеток колоректального рака человека линий COLO 320 HSR и SW837 к действию ИИ: значение D_0 составило 2,7 Гр и 2,6 Гр соответственно. Облучение опухолевых клеток линий COLO 320 HSR и SW837 в дозе 2 Гр приводило к снижению их выживаемости на 7 сутки до $74,92 \pm 1,79\%$ и до $75,30 \pm 5,89\%$ от контроля соответственно. Обнаружено, что инкубация опухолевых клеток с никлозамидом в течении 4 часов перед действием ИИ приводит к более выраженному в сравнении с действием только облучения снижению их выживаемости: до $61,42 \pm 0,23\%$ (линия COLO 320 HSR) и до $55,35 \pm 5,39\%$ (линия SW837). При увеличении длительности преинкубации с 4 до 24 часов наблюдали дальнейшее уменьшение количества живых клеток линии COLO 320 HSR до $54,57 \pm 0,23\%$, что свидетельствует о повышении их чувствительности к действию ИИ под влиянием никлозамида; анализ радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток линии SW837 в данных условиях был затруднён вследствие возросшей цитотоксичности самого препарата. Способность никлозамида повышать чувствительность клеток рака прямой кишки человека линии SW837 к действию ИИ была подтверждена при исследовании колониеобразующей активности. Так, комбинированное действие ИИ и никлозамида приводило к статистически значимому уменьшению количества колоний в сравнении с действием только ИИ (на $18,1 \pm 0,5\%$, $p < 0,01$), причём сам никлозамид был нетоксичен в данных экспериментальных условиях. Для выявления возможных механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток колоректального рака был исследован уровень β -катенина, отражающий активность сигнального пути Wnt/ β -катенин. Было обнаружено, что действие γ -излучения в дозе 2 Гр на клетки обеих исследованных линий не приводит к изменению количества β -катенина в клетках. При действии никлозамида на клетки линии COLO 320 HSR наблюдали снижение уровня исследуемого белка, причём более выраженное при комбинированном применении с ИИ. В тоже время, изменения количества β -катенина в клетках линии SW837 не наблюдали ни при действии никлозамида в концентрации 2 мкМ, ни при его совместном применении с ИИ, что может указывать на иной механизм радиосенсибилизирующего действия препарата в этих клетках.

Выводы. Обнаружено радиосенсибилизирующее действие никлозамида в отношении клеток рака сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR и рака прямой кишки человека линии SW837, в основе которого помимо изменения активности сигнального пути Wnt/ β -катенин могут лежать и другие механизмы.

Список литературы

1. Москалева Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Жирник А.С., Северин С.Е. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлозамида // Биомедицинская химия. 2015. Т. 6. №61. С. 680-693.
2. Lee S.L., Son A.R., Ahn J., Song J.Y. Niclosamide enhances ROS-mediated cell death through c-Jun activation // Biomed Pharmacother. 2014. V. 68. №5. P. 619-624.
3. You S., Li R., Park D., Xie M., Sica G.L., Cao Y., Xiao Z.Q., Deng X. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // Mol Cancer Ther. 2014. V. 13. №3. P. 606-616.
4. Yin L., Gao Y., Zhang X., Wang J., Ding D., Zhang Y., Zhang J., Chen H. Niclosamide sensitizes triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation in association with the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling // Oncotarget. 2016. V. 7. №27. P. 42126-42138.
5. Xiang M., Chen Z., Yang D., Li H., Zuo Y., Li J., Zhang W., Zhou H., Jiang D., Xu Z., Yu Z. Niclosamide enhances the antitumor effects of radiation by inhibiting the hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor signaling pathway in human lung cancer cells // Oncology letters. 2017. V. 14. №2. P. 1933-1938.
6. Жирник А.С., Семочкина Ю.П., Москалева Е.Ю., Крылов Н.И., Тубашева И.А., Кузнецов С.Л., Воронцов Е.А. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида в отношении клеток колоректального рака // Биомедицинская химия. 2017. Т. 63. №2. С. 132-138.

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ КРЫС В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ» И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ МОДИФИКАЦИИ L-ТРИПТОФАНОМ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ФАКТОРОВ РАДИАЦИОННОЙ И НЕРАДИАЦИОННОЙ ПРИРОДЫ

Е.М. Кадукова, Ф.И. Куц

ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», Гомель, Беларусь,
e-mail: helena.kad@mail.ru

Резюме. В экспериментах на крысах показано, что облучение в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 Гр изменяет поведенческие реакции крыс-самок, подвергнутых действию электромагнитного излучения радиочастотного диапазона и иммобилизационного стресса, в тесте Открытое поле. Введение L-триптофана оказывает анксиолитическое действие на крыс-самок, подвергнутых, как разделному действию стресса (иммобилизация), так и при сочетании этого фактора с облучением в дозе 2,0 Гр, и увеличивает исследовательскую активность животных.

Ключевые слова: поведенческие реакции, облучение, электромагнитное излучение, иммобилизационный стресс, L-триптофан

BEHAVIORAL REACTIONS OF RATS IN THE OPEN FIELD TEST UNDER THE COMBINED EFFECTS OF RADIATION AND NON-RADIATION FACTORS. THE POSSIBILITY OF THEIR CORRECTION BY L-TRYPTOPHAN

A.M. Kadukova, F.I. Kutz

Institute of radiobiology of NAS of Belarus, Gomel, Belarus,
e-mail: helena.kad@mail.ru

Summary. Behavioral reactions of rats after irradiation, electromagnetic radiation and “soft immobilization” in the Open field test were investigated. It was found that the levels of anxiety in the groups after exposure to ionizing radiation and immobilization were higher. Administration of L-tryptophan exerts an anxiolytic effect on female rats after separate action of immobilization and the combination of this factor with irradiation at a dose of 2.0 Gy, and increases the research activity.

Key words: behavioral reactions, radiation, electromagnetic radiation, immobilization stress, L-tryptophan

Поведенческие реакции организмов, как реакции высокочувствительные к антропогенным изменениям, используются для изучения механизмов поражения нервной системы при действии факторов разной природы.

Также очевидно, что экспериментальные модели поведения могут эффективно применяться в исследованиях по поиску средств, повышающих устойчивость организма к действию техногенных загрязнителей.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на крысах-самках (возраст 6 мес.) массой 235–250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при естественном освещении, со свободным доступом к воде и пище. В опыт отбирались особи с устойчивым эстральным циклом, синхронизированные по его стадиям. Крыс подвергали воздействию следующих факторов:

1) разделному и сочетанному воздействию внешнего облучения (ИИ) в дозах 0,5 и 1,0 Гр (^{137}Cs , 46,2 сГр/мин, однократно), и действию электромагнитного излучения радиочастотного диапазона (ЭМИ РЧ) на экспериментальной установке, имитирующей сигнал мобильной связи с несущей частотой электромагнитного поля –

900±3 МГц ежедневно по 8 ч фракциями (16×30 мин с интервалом в 5 мин) в течение 14 суток, начало экспозиции через сутки после воздействия радиации;

2) раздельному и сочетанному воздействию ИИ в дозах 0,5 и 2,0 Гр (^{137}Cs , 46,2 сГр/мин, однократно) и действию стресса (иммобилизация в тесных пеналах) в течение 7 дней по 3 часа. Для коррекции нарушений поведенческой активности крысы употребляли водный раствор L-триптофана с 1-х суток после действия ИИ до вывода из эксперимента. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Контролем служили крысы-самки аналогичного возраста, не подвергавшиеся воздействию ИИ и ЭМИ РЧ, и иммобилизационному стрессу.

Эмоциональную реактивность, двигательную и исследовательскую активность крыс изучали в тесте «Открытое поле» (ОП) в течение 5 минут: в эксперименте 1) на 1-е сутки после окончания воздействия ЭМИ; в эксперименте 2) – на 1-е и 15-е сутки после окончания действия иммобилизации. Поведение в ОП оценивали, используя следующие поведенческие показатели: число пересеченных периферических и центральных квадратов (горизонтальная двигательная активность), стойки с заходом и без захода передних лапок на стенки арены (вертикальная двигательная активность). Отдельно регистрировали неспецифическое поведение животных – число актов дефекации и уринации, частоту актов груминга (короткий и длительный). Вычисляли суммарные показатели горизонтальной активности и общей двигательной активности в ОП [1].

Рассчитывали интегральную оценку параметров поведения в ОП по методике, описанной в [2]. На основании проведенных расчетов вычисляли интегральные уровни тревожности и исследовательской активности.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи непараметрического анализа с определением T-критерия теста Манна-Уитни (пакет программ Statistica 6.0).

Результаты. Воздействие ЭМИ РЧ модифицировало ответную реакцию облученных крыс-самок, оцениваемую по изменению поведенческих паттернов в предъявляемом им ОП. Так, интегральный уровень тревожности у облученных в дозе 1,0 Гр крыс после дополнительного воздействия ЭМИ был максимальным и на 156,7 %, и 271,8 % превышал уровень контроля и воздействия дозы ИИ 1,0 Гр соответственно.

Изменение исследовательской активности после воздействия ЭМИ в раздельном и сочетанном с ИИ режиме имело свои особенности: если после воздействия в раздельном режиме ЭМИ и облучения в дозе 1,0 Гр исследовательская активность крыс-самок повышалась (на 7,6 % и 32,5 % соответственно), после облучения в дозе 0,5 Гр имела тенденцию к снижению (на 16,0 %), то после воздействия ЭМИ на облученных в дозе 1,0 Гр крыс была снижена на 30,6 % и на 47,6 % по сравнению со значением в контроле и в группе «1,0 Гр».

После воздействия ионизирующего излучения в дозе 2,0 Гр (8-е сутки) отмечена тенденция к увеличению как интегрального показателя исследовательской активности (в основном, за счет увеличения двигательной активности в периферической части арены) в 1,4 раза, так и интегрального уровня тревожности в 2,5 раза по сравнению с уровнем контроля.

После дополнительного действия стресс-фактора на первые сутки после окончания воздействия иммобилизации отмечалось дозозависимое увеличение значений интегрального уровня тревожности в 2,3 и 2,6 раза по сравнению с уровнем контроля при дозах воздействия 0,5 и 2,0 Гр соответственно ($p < 0,05$).

На 22-е сутки после воздействия радиационного фактора в дозе 0,5 Гр значение уровня тревожности соответствовало уровню контроля, а интегральной оценки исследовательской активности превышало его в 1,3 раза ($p < 0,05$). После воздействия

ИИ в дозе 2,0 Гр значение уровня тревожности имело тенденцию к повышению, а исследовательской активности – к снижению по сравнению с уровнем соответствующего контроля.

При сочетанном действии радиации и иммобилизационного стресса в этот срок отмечались различия в поведенческой активности крыс-самок в тесте ОП, зависящие от величины дозы облучения. Так, интегральный уровень тревожности после облучения в дозе 0,5 Гр значительно превышал соответствующие показатели контроля, отдельного воздействия облучения (в 3,2 раза) и стресса (в 1,6 раза) при $p < 0,05$. После воздействия ионизирующего излучения в дозе 2,0 Гр интегральный уровень тревожности не превышал соответствующие значения в группах «облучение 2,0 Гр» и «стресс», но был выше уровня контроля в 2,4 раза.

Введение L-триптофана снизило тревожность стрессированных животных на 25,0 % на 1-е и на 52,4 % на 15-е сутки после окончания действия иммобилизации по сравнению с соответствующей группой «стресс», а у облученных и стрессированных животных – соответственно на 48,0 % и 8,6 % по сравнению с соответствующей группой «2,0 Гр + стресс».

Кроме того, установлено, что на 22-е сутки после облучения в дозе 2,0 Гр на фоне введения триптофана исследовательская активность животных возросла практически в 2 раза по сравнению с группой «2,0 Гр».

Выводы. Полученные данные показывают, что облучение в дозах 0,5, 1,0 и 2,0 Гр изменяет поведенческую активность крыс-самок, подвергнутых действию ЭМИ РЧ и иммобилизационному стрессу, в тесте Открытое поле.

Введение L-триптофана оказывает анксиолитическое действие на крыс-самок, подвергнутых, как отдельному действию стресса (иммобилизация), так и при сочетании этого фактора с облучением в дозе 2,0 Гр, а также значительно увеличивает исследовательскую активность после облучения в этой дозе.

Список литературы

1. Буреш М., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: «Высшая школа», 1991. – С. 119–122.
2. Бессалова Е.Ю. Методика исследования поведения крыс в условиях «Открытого поля» // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. 2011. Т. 7, № 1-2. С. 106-110.

ПОДДЕРЖАНИЕ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ* ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА КАК СПОСОБ СНИЖЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ РИСКОВ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

*А.И. Кобатов*¹, *Н.Б. Вербицкая*¹, *О.В. Добролеж*¹, *Е.А. Гуреева*², *И.В. Кутник*³

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kobатов@hpb-spb.com

² ПАО «Ракетно-космическая корпорация «Энергия» имени С.П. Королева», г. Королев, Московская область

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский центр подготовки космонавтов имени Ю.А. Гагарина», г. Звездный, Московская область

Резюме. Известно, что под влиянием повышенного радиационного фона на борту космического корабля могут наблюдаться качественные и количественные изменения состава микрофлоры, заселяющей слизистую поверхность желудочно-кишечного тракта человека, вследствие чего снижается ее резистентность по отношению к внешним патогенам и возникают дополнительные медицинские риски для членов экипажа. Предложен подход к снижению уровня медицинских рисков посредством получения и использования на борту корабля кисломолочного пробиотического продукта, восстанавливающего кишечную микрофлору и поддерживающего колонизационную резистентность организма.

Ключевые слова: микрофлора, ионизирующее излучение, пробиотик, кисломолочный продукт, *Lactobacillus acidophilus*.

SUSTAINING THE COLONIZATION REISTANCE OF THE HUMAN ORGENISM AS A WAY TO REDUCE HEALTH RISKS AT SPACEFLIGHT

*A.I. Kobatov*¹, *N.B. Verbitskaya*¹, *O.V. Dobrolezh*¹, *E.A. Gureeva*², *I.V. Kutnik*³

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

e-mail: kobатов@hpb-spb.com

² RSC Energia, Korolev, Moskovskaya obl.

³ Yu.A. Gagarin Research & Test Cosmonaut Training Center, Zvezdnyi, Moskovskaya obl.

Summary. It has been known that an increased radiation background on board a spaceship may cause qualitative and quantitative alterations in a cosmonaut intestinal tract microflora. This may result in a reduction of microflora resistance to external pathogens and may cause additional health risks to cosmonauts. Here we suggest the approach to mitigate a cosmonaut health risks by production and use of the fermented milk probiotic product on board a spaceship. This probiotic product is beneficial for microflora set up and maintenance of the colonization resistance of the human organism.

Key words: microflora, ionizing radiation, probiotic, fermented milk product, *Lactobacillus acidophilus*.

Первостепенной задачей при выполнении дальнего космического полета является обеспечение сохранности необходимого уровня функциональной активности членов экипажа корабля. В первую очередь это подразумевает обеспечение необходимой степени радиационной защиты человека от ионизирующего излучения, сопровождающего космонавта на протяжении всей космической экспедиции.

Расчеты показывают, что за 12 месяцев полета на Международной космической станции (МКС) космонавты получают эквивалентную дозу равную приблизительно 100 мЗв. В то же время датчик, установленный на борту «Curiosity» показал, что эквивалентная доза поглощенного радиационного облучения, полученная на протяжении 6 месяцев полета к Марсу равносильна примерно 1 году, проведенному на борту МКС [1].

В связи с этим, является актуальным поиск средств, позволяющих стимулировать естественный процесс восстановления биологических структур, поврежденных в результате воздействия ионизирующего излучения.

Известно, что в первую очередь при облучении поражаются клетки активно растущих тканей организма [2]. У человека это клетки кроветворной системы (время полного обновления клеток крови в норме составляет от 20 до 40 часов) и клетки эпителия слизистой, выстилающей желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) (время обновления - 2-6 суток) [3]. В то же время, к активно делящимся относят также и клетки нормальной микрофлоры, заселяющей внутренние полости тела человека. Так микроорганизмы, заселяющие слизистую оболочку тонкого кишечника, делятся за 20-24 часа [4].

В работе [5] показано, что под влиянием факторов космического полета (ФКП) изменяется состав кишечной микрофлоры космонавта. В первую очередь отмечается возрастание количества патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в то время как уровень содержания микрофлоры «защитных групп» - молочнокислых и бифидобактерий, резко снижается. Вследствие этого снижается также и уровень колонизационной резистентности организма и возрастает вероятность его инфицирования внешними патогенами.

Одним из методов, позволяющих повысить уровень колонизационной резистентности организма, является метод пробиотикотерапии [5]. Пробиотики – это особый класс препаратов, в состав которых входят жизнеспособные клетки штаммов полезных для здоровья человека микроорганизмов, в первую очередь молочнокислые бактерии и бифидобактерии. Показано, что прием пробиотиков (лактобактерин и бифидумбактерин) на этапах предполетной подготовки и в период реабилитации экипажа космического корабля позволил снизить негативные последствия, вызванные действием ФКП [5].

Доказано, что наибольшим пробиотическим потенциалом обладают клетки *Lactobacillus acidophilus*. Причем их потенциал выше, когда они находятся в активном физиологическом состоянии, например, в виде кисломолочного продукта [6].

В связи с этим, в ФГБУ ГНЦ ФБМЦ имени А.И. Бурназяна исследовали эффективность применения пробиотика «Симбиотический комплекс ацидофильных бактерий «Витафлор», состоящего из 2-х штаммов *L. acidophilus*, для профилактики и лечения острой лучевой болезни (ОЛБ) у мышей. Было показано, что сочетанное применение пробиотика и антибиотиков (гентамицин и нистатин) снижало смертность облученных животных и увеличивало продолжительность их жизни за счет подавления искусственно вызванной протейной инфекции. Использование одних антибиотиков для лечения ОЛБ в этих опытах было неэффективно. По результатам исследования был сделан вывод о возможности использования пробиотика «Витафлор» «в качестве дополнительного средства для профилактики и лечения последствий ОЛБ у профессионалов, контактирующих с ионизирующим излучением» [7].

Учитывая вышесказанное, мы сформулировали предложение о необходимости наличия на борту пилотируемого космического корабля, совершающего длительную космическую экспедицию, пробиотического кисломолочного продукта, содержащего в своем составе клетки *L. acidophilus*.

С этой целью на РС МКС в настоящее время в рамках реализации космического эксперимента «Пробиовит» апробируется технология, позволяющая получать на борту ПКК кисломолочный продукт, содержащий живые клетки *L.acidophilus* и обладающий пробиотическими свойствами. Первоначально на Земле была разработана технология получения сухого биопрепарата (патент РФ № 2487547), состоящего из 2-х компонентов: посевного материала и питательной среды. В качестве посевного материала используются клетки *L. acidophilus*, входящие в состав пробиотика «Витафлор». В качестве питательной среды – сублимационно высушенное и измельченное питьевое молоко. Препарат расфасовывается на Земле в типовые спецпакеты, используемые для доставки на борт МКС сухих пищевых продуктов. На борту ПКК в пакет вносится необходимое количество питьевой воды, после чего регидратированный продукт помещается в бортовой термостат при 37° С на 22-24 часа. Полученный в результате термостатного культивирования кисломолочный продукт переносится в бортовой холодильник, где и находится до момента использования.

К настоящему времени с участием экипажей МКС-50 и МКС-52 (космонавты А. Борисенко, С. Рыжиков, С. Рязанский и Ф. Юрчихин) на борту МКС проведены два эксперимента, в результате которых были получены кисломолочные продукты с высоким пробиотическим потенциалом: титром жизнеспособных лактобацилл, кислотностью, устойчивостью в отношении антибиотиков, высоким уровнем и широким спектром антагонизма в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

_____ * - колонизационная резистентность – совокупность защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических свойств нормальной микрофлоры кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию слизистых оболочек посторонними, в том числе патогенными, микроорганизмами.

Список литературы

1. <http://www.km.ru/front-projects/amerikanzi-nikogda-ne-letali-na-lunu/vyhe-24-000-km-nad-zemlei-radiatsiya-ubivaet-vse-zhivoe>
2. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных/М.: Высшая школа, 2004.549 с.
3. Человек. Медико-биологические данные/М.: Медицина, 1977. 493 с.
4. Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов/Учебник в 3-х томах. Т. 2: Из-во С.-Петербургского ун-та, 2007. 330 с.
5. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания/М.: Наука, 2005. 275 с.
6. NATO ASI Series. Vol. H 98 Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications/Edited by F. Vozoglu and B. Ray. Berlin: Springer, 1996. P.1–136.
7. Иванов А.А., Симбирцев А.С., Мальцев В.Н. и др. Снижение опасности носительства условно-патогенной микрофлоры при радиационном поражении с помощью пробиотика «Витафлор»//Медицина экстремальных ситуаций, 2013. № 1(43). С.76–81.

МАГНИТНЫЕ ИЗОТОПЫ: НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ НОВЫХ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СРЕДСТВ

Л.В. Авдеева¹, Т.А. Евстюхина², В.К. Кольтовер¹, В.Г. Королев²,
Ю.А. Кутлахмедов³

¹ Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка,
Московская область, Россия, e-mail: koltover@icp.ac.ru

² Петербургский Институт ядерной физики - НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина,
Ленинградская область, Россия

³ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН, Киев, Украина

Резюме. После рентгеновского облучения восстановление клеток *S. cerevisiae*, обогащенных магнитным изотопом магния ²⁵Mg, идет вдвое быстрее, чем восстановление клеток, обогащенных немагнитным изотопом ²⁴Mg. При этом доля необратимых повреждений в клетках, обогащенных ²⁵Mg, на 60% меньше по сравнению с клетками, обогащенными ²⁴Mg. Полученные результаты демонстрируют возможность создания новых радиопротекторов на основе стабильных магнитных изотопов.

Ключевые слова: облучение, пострадиационное восстановление, магнитно-изотопный эффект, надежность

MAGNETIC ISOTOPES AS THE NEW TREND IN ANTI-RADIATION MEDICINE

L.V. Avdeeva¹, T.A. Evstyukhina², V.K. Koltover¹, V.G. Korolev²,
Y.A. Kutlakhmedov³

¹ Institute of Problems of Chemical Physics, RAS, Chernogolovka,
Moscow Region, Russia, e-mail: koltover@icp.ac.ru

² Petersburg Institute of Nuclear Physics, NRC “Kurchatov Institute,
Gatchina, Leningrad Region, Russia

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS, Kiev, Ukraine

Summary. After X-ray irradiation, the process of recovery of the cells *S. cerevisiae*, enriched with the magnetic magnesium isotope, ²⁵Mg, proceeds two times faster than the post-radiation recovery of the cells enriched with the nonmagnetic isotope, ²⁴Mg. At this, the fraction of the irreversible damages in the cells enriched with ²⁵Mg was 60 percent less than in the cells enriched with ²⁴Mg. Thus, ²⁵Mg and, probably, some other stable magnetic isotopes hold much promise in creating novel anti-radiation protectors.

Key words: radiation, post-radiation recovery, magnetic-isotope effect, reliability, robustness.

С середины прошлого столетия атомная энергетика стала частью повседневной жизни. К сожалению, «человеческий фактор» делает неизбежными аварии, даже катастрофы, как это было в Уиндскейле (Англия, 1957), Три-Майл-Айленде (США, 1979), Чернобыле (Украина, 1986) и Фукусиме (Япония, 2011). Нужно заблаговременно принимать меры предосторожности, направленные на уменьшение пагубных последствий воздействия радиации на специалистов атомной промышленности и население территорий, загрязненных радиацией. Для защиты от хронического излучения в малых дозах необходимы малотоксичные лекарственные средства, пригодные для долгосрочного применения в качестве пищевых добавок. В этом плане интересны стабильные магнитные изотопы химических элементов – элементов, которые в норме входят в состав биомолекулярных нанореакторов живых клеток.

Целью нашей работы было изучить влияние различных изотопов магния на пострадиационное восстановление дрожжевых клеток *Saccharomices cerevisiae*. Магний

представляет особый интерес как один из наиболее распространенных элементов в живой природе. Магний имеет три стабильных изотопа, ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg , с природным соотношением 78,7, 10,13 и 11,17 %, из которых только ^{25}Mg является магнитным изотопом (имеет ядерный спин $I = 5/2$) и создает магнитное поле, тогда как ^{24}Mg и ^{26}Mg – немагнитные изотопы (ядерный спин $I = 0$).

Выполнены эксперименты с клетками, обогащенными различными изотопами магния – магнитным ^{25}Mg или немагнитным ^{24}Mg . Были приготовлены варианты стандартной жидкой питательной среды МЗ, содержащей различные изотопы магния в виде сульфатов магния. После трех суток культивирования в условиях непрерывной аэрации при 30 °С клетки отмывали от питательной среды, ресуспендировали в стерильном фосфатном буфере, рН 7.0 («голодная среда») и облучали в этой же среде рентгеновским излучением (300 Гр). Для изучения кинетики восстановления облученные клетки инкубировали при 30 °С в той же «голодной среде» заданное время с последующим высевом на агар в чашки Петри для оценки способности клеток формировать колонии.

Выживаемость клеток, перенесенных в питательную среду (агар) сразу же после облучения, не превышала нескольких процентов. После облучения в такой дозе большинство клеток не успевает репарировать поврежденные генетические структуры до наступления митоза, и при клеточном делении возникают нежизнеспособные дочерние клетки. Инкубация в «голодной среде», в которой клетки не делятся, обеспечивает им дополнительное время для репарационных процессов и соответственно увеличивается выживаемость клеток. Было обнаружено, что клетки, обогащенные изотопом ^{25}Mg , восстанавливаются эффективнее, чем клетки, обогащенные изотопом ^{24}Mg . А именно: кинетика восстановления клеток, обогащенных магнитным изотопом, ^{25}Mg , характеризуется существенно большей константой скорости восстановления по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным ^{24}Mg : $0.050 \pm 0.004 \text{ час}^{-1}$ и $0.029 \pm 0.003 \text{ час}^{-1}$, соответственно с ^{25}Mg и ^{24}Mg (различие между средними значениями статистически достоверно при $P = 0.02$). Более того, доля необратимых лучевых повреждений оказалась на 60% меньше в клетках, обогащенных магнитным ^{25}Mg , по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным изотопом. Аналогичный магнитно-изотопный эффект ранее был обнаружен нами в экспериментах с облучением дрожжевых клеток жестким УФ светом ($\lambda = 240\text{-}260 \text{ нм}$, $J = 100\text{-}300 \text{ Дж/м}^2$). Для клеток, обогащенных ^{25}Mg , константа скорости восстановления оказалась равной $0.058 \pm 0.004 \text{ час}^{-1}$, тогда как для клеток, обогащенных ^{24}Mg , почти вдвое меньше, $0.032 \pm 0.003 \text{ час}^{-1}$ ($P = 0.02$). Доля необратимых лучевых повреждений при УФ облучении почти не изменяется [1]. Таким образом, в экспериментах с облучением клеток ионизирующей радиацией, как и в экспериментах с облучением коротковолновой УФ радиацией, обнаружен достоверный и значительный по величине радиозащитный эффект магнитного изотопа магния.

Можно было бы предположить, что причиной обнаруженных различий служит различное содержание примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в среду роста с различными изотопами магния. Однако такое предположение исключается данными элементного анализа использованных растворов и сред методами атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения, выполненных в Институте проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (руководитель аналитического центра проф. В.К. Карандашев). Элементный состав ростовых сред был одинаков, независимо от типа изотопа магния, при содержании примесных элементов менее мкМ/л.

Так как для репарационных процессов, прежде всего – для репарации и синтеза ДНК, необходим АТФ, то можно предположить, что обнаруженный радиозащитный

эффект обусловлен более высокой эффективностью изотопа ^{25}Mg , по сравнению с немагнитным изотопом магния, в качестве Mg^{2+} -кофактора «топливно-силовых» нанореакторов клетки. Действительно, в экспериментах с одним из важнейших молекулярных моторов биоэнергетики – мышечным белком миозином обнаружена значительная, в 2-2,5 раза, стимуляция АТФ-гидролазной активности миозина при замене немагнитного изотопа магния, ^{24}Mg или ^{26}Mg , на магнитный изотоп ^{25}Mg [2]. Аналогичный эффект магнитного изотопа ^{25}Mg («ядерный спиновый катализ») обнаружен в экспериментах по влиянию различных изотопов магния на АТФ-гидролазную активность H^+ -АТФазы, изолированной из митохондрий дрожжей [3]. Детальные физико-химические механизмы ядерного спинового катализа и биологические механизмы его усиления в живых клетках – задачи дальнейших исследований [4, 5].

Таким образом, в наших экспериментах обнаружен радиозащитный эффект магнитного изотопа магния: пострадиационное восстановление клеток, обогащенных магнитным изотопом магния, идет вдвое быстрее, чем восстановление клеток, обогащенных немагнитным изотопом этого элемента. Магний – один из наиболее распространенных элементов в живой природе. Известно большое число лекарственных соединений, содержащих магний, например, кардиомагний. Полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность создания новых малотоксичных радиопротекторов на основе стабильного магнитного изотопа магния – «пищевых добавок», пригодных для защиты от действия хронической радиации.

Работа выполнена по теме Государственного задания (0089-2014-0042, НИОКР 01201361868) при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00593).

Список литературы

1. Koltover V.K., Korolev V.G., Kutlakhmedov Y.A. Antioxidant prophylaxis of radiation stress. In: *Ionizing Radiation: Applications, Sources and Biological Effects.* /eds. E. Belotserkovsky, Z. Ostaltsov. New York, Nova Science Publishers Inc., 2013, pp. 117-128.
2. Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К., Костерин С.А. Магнитный изотоп магния ускоряет реакцию гидролиза АТФ миозином. // *Биофизика.* 2016. Vol. 61, № 2. С. 239-246.
3. Koltover V.K., Graber P., Karandashev V.K., Starke I., Turina P. Magnetic-isotope effects in synthesis and hydrolysis of ATP catalyzed by mitochondrial H^+ -ATP synthase/hydrolase: In: *Abstracts of 11th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”.* /eds. V. Tishkov, V. Fedorchuk (Electronic resource) – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, pp. 50-51. ISBN 978-5-9500292-3-3.
4. Авдеева Л.В., Кольтовер В.К. Ядерный спиновый катализ в живой природе. // *Вестн. Моск. ун-та, сер. 2 «Химия».* 2016. Vol. 57, № 3. С. 145-153.
5. Koltover V.K. Nuclear spin catalysis: from physics of liquid matter to medical physics. // *J. Mol. Liquids.* 2017. Vol. 235. P. 44-48.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СНИЖЕНИЯ ПОБОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИСТАМИНА ПРИ ЕГО ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ

С.Ю.Краев, И.С. Драчёв, А.Б. Селезнёв

ФГБУ Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины
министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: r.laboratory@yandex.ru

Резюме. В экспериментах на крысах изучено влияние цистамина, введенного внутривнутрибрюшинно и в виде аэрозоля на течение и исходы острого радиационного поражения, а также возможность снижения проявлений нежелательных побочных эффектов препарата. Аэрозольное введение цистамина, в отличие от внутривнутрибрюшинного, способствовало расширению интервала гибели облученных животных. При внутривнутрибрюшинном способе введения препарата гибель начиналась на 5 сут и продолжалась до 14 сут. При аэрозольном введении 70 % животных погибло в период с 8 по 18 сут. Внутривнутрибрюшинное введение цистамина вызывало через 20-30 мин развитие выраженной гиподинамии у 100 % крыс. Продолжительность плавания с грузом (10 % массы тела) у животных данной экспериментальной группы составляла 259 с. Физическая выносливость крыс, получавших цистамин в виде аэрозоля, была выше. Продолжительность плавания в данной группе была в 1,6 раза больше и составляла 420 с. Показано, что ингаляция аэрозоля цистамина снижает выраженность проявлений побочных эффектов препарата.

Ключевые слова: облучение, цистамин, аэрозоль, ингаляция, переносимость.

STUDY THE POSSIBILITY OF REDUCING THE SIDE EFFECT OF CYSTAMINE IN ITS INHALATION ADMINISTRATION

S.Y. Kraev, I.S. Drachev, A.B. Seleznev

Federal State Budgetary Establishment «State Scientific Research Test Institute Of The
Military Medicine» Defense Ministry Of The Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, e-
mail: r.laboratory@yandex.ru

Summary. In experiments on rats, the effect of cystamine, administered intraperitoneally and inhalation on the course and outcomes of acute radiation injury. The possibility of reducing of the manifestations of undesirable side effects of the drug was studied. Aerosol administration of cystamine, in contrast to intaperitoneal, contributed to the expansion of the interval of death of irradiated animals. With the intaperitoneal route of drug administration, death began on day 5 and lasted up to 14 day. When aerosolized 70 % of animals died in the period from 8 to 18 days. Intraperitoneal administration of cystamine caused after 20-30 min the development of severe hypodinamia in 100 % rats. The duration of the voyage with the load (10 % of the body weight) in the animals of this experimental group was 259 sec. the physical endurance of rats reseiving cystamine in the form of an aerosol was higher. The duration of the voyage in this group was 1,6 times larger and amounted to 420 sec. It is shown that inhalation of cystamine reduces the severity of manifestations of side effects of the drug.

Key words: irradiation, cystamine, inhalation, aerosol, tolerability.

В условиях острого облучения с высокой мощностью дозы важное практическое значение имеют радиопротекторы. К сожалению, практически все известные препараты этой фармакологической группы, включая разрешенные к медицинскому применению, далеко не в полной мере соответствуют современным требованиям как по эффективности, так и по переносимости. [1]. В частности, серьезной проблемой является кумуляция токсического действия радиопротекторов при их введении в

организм, что не позволяет обеспечивать длительную противолучевую защиту, необходимую в условиях угрозы внезапного облучения в дозах, вызывающих развитие острой лучевой болезни. Это существенно ограничивает перспективы практического использования средств профилактики острых радиационных поражений [2, 3].

В настоящее время одним из наиболее эффективных радиопротекторов остается цистамин — препарат, относящийся к группе меркаптоалкиламинов и способный накапливаться в тканях с наиболее высоким уровнем физиологической регенерации, прежде всего в костном мозге [4, 5]. Цистамин применяется при угрозе высокоинтенсивного воздействия ионизирующего излучения, при котором не исключается вероятность облучения в дозах, вызывающих острую лучевую болезнь.

Известно, что радиозащитные дозы цистамина могут вызывать побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта (диспептические явления в виде дискомфорта и жжения в области эпигастрия, тошнота, рвота, диарея) и сердечно-сосудистой системы (гипотензия) [1].

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности снижения побочного действия цистамина путем его введения в виде аэрозоля.

Опыты проведены на белых беспородных крысах самцах массой 200-250 г. Радиозащитную эффективность цистамина оценивали у животных, облученных в дозе $LD_{90/30}$ (6,5 Гр). Переносимость препарата оценивали по его влиянию на физическую выносливость крыс в тесте «плавание с грузом до утопления» [6]. Одной группе животных цистамин вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг за 30 мин до облучения. Крыс другой группы помещали в ингаляционную камеру с ультразвуковым небулайзером, заполненную аэрозолем 10 % водного раствора цистамина. Диаметр частиц аэрозоля составлял 0,8-2 мкм. Животные находились в ингаляционной камере в течение 120 мин (расчетная вдыхаемая доза 60 мг/кг), после чего их подвергали воздействию γ -облучения на установке ИГУР-1 (мощность дозы 1,1 Гр/мин). Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили 0,9 % раствор хлорида натрия, или помещали в ингаляционную камеру, заполненную аэрозолем 0,9 % раствор хлорида натрия.

Радиозащитная эффективность препарата оценивали учитывая ежедневную гибель облученных животных на протяжении 30 сут. Рассчитывали выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) крыс по группам. Во время наблюдения обращали внимание на общее состояние и объективные проявления острого радиационного поражения (ОРП). Переносимость препарата оценивали по его проявлению на физическую работоспособность облученных животных. К хвосту крысы прикрепляли груз массой 10 % от массы тела, затем их помещали в бассейн. Учитывали время плавания каждого животного до утопления. Рассчитывали среднее время плавания по группе.

Облучение в дозе 6,5 Гр приводило к развитию у крыс тяжелой костномозговой формы острого радиационного поражения. Гибель облученных животных начиналась, в среднем на 5-7 сут. При «классическом» (внутрибрюшинном) способе введения цистамина гибель животных наблюдалась с 10 по 19 сут. Пик гибели приходился на 19 сут. Аэрозольное введение 10 % водного раствора цистамина способствовало расширению интервала гибели, 70 % крыс погибло в период с 8 по 18 сут. В этот период животные гибли достаточно равномерно.

Внутрибрюшинное введение цистамина в радиозащитной дозе вызывало через 20-30 мин развитие выраженной гиподинамии у 100 % крыс. Животные находились без движения, интереса к экспериментатору не проявляли. Физическая выносливость крыс также была резко снижена. Продолжительность плавания с грузом у животных данной экспериментальной группы составляла 259 с. Иную картину наблюдали после

аэрозольного введения радиопротектора. Физическая выносливость крыс, получавших цистамин в виде аэрозоля, была несколько выше. Они активно работали лапами, а продолжительность плавания была почти в 1,5 раза больше и составляла 420 с. Лучшие показатели переносимости наблюдали у крыс которым внутрибрюшинно вводили 0,9 % раствор хлорида натрия — 826 с, тогда как, ярко выраженная гиподинамия наблюдалась у животных с ингаляционным введением «плацебо» — 329 с.

Ингаляционное введение аэрозоля водного раствора цистамина способствовало менее выраженному проявлению побочных эффектов препарата, что выражалось в сохранении большей физической выносливости крыс данной группы по сравнению с животными, получавшими цистамин «классическим» способом. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения возможности ингаляционного введения цистамина, как способа снижения его нежелательных побочных эффектов.

Список литературы

1. Васин М.В. Средства профилактики и лечения лучевых поражений. — М., 2006 — 340 с.
2. Гребенюк, А.Н. Принципы, средства и методы медицинской противорадиационной защиты / А.Н. Гребенюк, В.В. Зацепин, А.А. Тимошевский // Медицина катастроф. — 2007. — Т.59, № 3. — С. 32-35.
3. Легеза, В.И. Медицинская защита при радиационных авариях: некоторые итоги и уроки чернобыльской катастрофы / В.И. Легеза, А.Н. Гребенюк, В.В. Зацепин // Радиационная биология. — 2011. — Т. 51, № 1. — С. 70-75.
4. Владимиров В.Г., Красильников И.И., Арапов О.В. Радиопротекторы: структура и функции / Под ред. Владимирова В.Г. — Киев: Наук. думка, 1989. — 264 с.
5. Калистратов Г.В. Распределение по тканям в организме выведение из организма здоровых и облученных мышей С14-β-меркаптопропиламина / Г.В. Калистратов // Радиобиология, 1964. — Т. 4, вып. 3, С. 194-198
6. Бобков Ю.Г. Фармакологическая коррекция утомления / Ю.Г. Бобков, В.М. Виноградов и др. // М.: Медицина, 1984. — 208 с.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С РАЗРАБОТКОЙ РАДИОПРОТЕКТОРОВ.

И.И. Красильников.

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: r.laboratory@yandex.ru

Резюме: Актуальность проблемы фармакологической противорадиационной защиты человека определяется не только возрастающей опасностью возникновения лучевых поражений, но и новыми требованиями, предъявляемыми к противолучевым средствам, включая радиопротекторы. Рассмотрены несколько перспективных направлений поиска и разработки радиопротекторов, обладающих улучшенными характеристиками.

Ключевые слова: радиопротекторы, рациональный поиск, модификация структуры, лекарственные формы, радиозащитные рецептуры, молекулярно-клеточные мишени, индикаторы эффективности, аптечные препараты.

PERSPECTIVE TRENDS OF INVESTIGATIONS RELATED TO ELABORATION OF RADIOPROTECTORS.

I.I. Krasilnikov.

Federal State Budgetary Establishment «State Scientific Research Test Institute of the military medicine» Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia,
e-mail: r.laboratory@yandex.ru

Summary. Actuality of problem of pharmacological antiradiation man protection is formed by accelerated danger of radiation lesions and new requirments to antiradiation drugs including radioprotectors. It is examined some forward-looking trends of search and elaboration of radioprotectors with improved characteristics.

Key words: radioprotectors, rational search, structure modification, drag forms, radioprotective mixtures, molecular- cell targets, indicators of effect, chemist's preparations.

Проблема лекарственной профилактики радиационных поражений остается актуальной в связи с возрастающей опасностью возникновения лучевых поражений человека и в мирное время, и в условиях военных конфликтов, а также отсутствием противолучевых средств, полностью удовлетворяющих современным требованиям. Указанная проблема пока не может быть решена созданием какого-то одного универсального радиопротектора, обеспечивающего высокоэффективную защиту организма при любых вариантах радиационных воздействий и не обладающего к тому же побочным действием.

Анализ данных научной и патентной литературы, материалы собственных работ позволяют выделить ряд направлений исследований, которые представляются перспективными в плане совершенствования радиопротекторов, предназначенных к использованию в системе медицинской противорадиационной защиты применительно к конкретным ситуациям.

К числу таких направлений мы отнесли:

1. Рациональный поиск и отбор потенциальных радиопротекторов среди синтетических и природных соединений, исходя из особенностей их физико-химических свойств и биологической активности, т.е. способности блокировать уже известные механизмы повреждающего действия радиации [1].

2. Подробное изучение имеющихся радиопротекторов с целью выявления у них новых свойств, позволяющих расширить показания к применению (например, активаторы биосинтеза цАМФ могут быть одновременно и радиопротекторами, и радиомитигаторами).

3. Модификация химической и пространственной структуры радиопротекторов с учетом обнаруженных ранее корреляций структура-активность, структура-токсичность, структура-биодоступность и пр., получение радиопротекторов в форме «пролекарств», объединение в одной молекуле двух компонентов разных классов с радиозащитной активностью [2].

4. Разработка радиозащитных рецептур, позволяющих потенцировать противолучевой эффект, снизить токсичность, купировать побочные эффекты, расширить диапазон эффективного применения средства, получить полифункциональные препараты, сочетающие, например, свойства радиопротектора и блокатора проявления симптомов первичной реакции на облучение и пр. [3].

5. Получение таргетных («мишенных») форм радиопротекторов, обеспечивающих направленную доставку активных молекул к определенным органам, клеткам, клеточным органеллам (например, митохондриальных антиоксидантов) [4].

6. Разработка оптимальных схем применения радиопротекторов (например, рациональное дозирование препарата пропорционально предполагаемой дозе облучения).

7. Разработка на основе современных технологий новых лекарственных форм и способов введения в организм радиопротекторов в целях удобства применения, повышения биодоступности и устойчивости при хранении, пролонгирования эффекта, снижение доз и пр.

8. Поиск новых «мишеней», фармакологическое воздействие на которые приводит к повышению радиорезистентности. Уже известными «мишенями» такого рода являются альфа-адренорецепторы различных типов, гистаминовые H_2 -рецепторы, толл-подобные рецепторы, рецепторы гормонов, гистоновая деацетилаза, циклооксигеназа 2 АПФ, ядерный фактор NF κ B и др. [1,2,5].

9. Разработка радиопротекторов различного целевого назначения: радиопротекторов экстренной профилактики лучевых поражений; радиопротекторов длительного действия, эффективных при пролонгированном облучении с низкой мощностью дозы; радиопротекторов для пациентов, подвергающихся диагностическому или лечебному облучению и др. [6].

10. Оценка радиозащитного потенциала аптечных лекарственных препаратов различных групп с целью выявления новых радиопротекторов, ускоренного принятия их на снабжение и использования «вне инструкции» в экстремальных ситуациях.

11. Поиск новых индикаторов радиорезистентности и разработка новых моделей для оценки эффективности разрабатываемых средств [7].

12. Изучение возможности спонтанного или стимулированного синтеза радиопротекторов непосредственно в радиочувствительных тканях, используя вводимые извне структурные элементы молекулы радиопротектора.

13. Использование в раннем постлучевом периоде фармакологических или химических антагонистов примененного радиопротектора с целью купирования тех его эффектов, которые становятся ненужными или препятствуют постлучевой репарации [2].

14. Изучение в качестве радиопротекторов пищевых продуктов и пищевых добавок (например, куркумина).

15. Исследование перспектив модификации радиорезистентности организма через систему трансмембранных белков (G-протеинов).

16. Разработка методов активации генов, контролирующих синтез эндогенных радиопротекторов.

17. Использование информационных свойств воды для доставки информации о радиопротекторах в биологическую систему.

Список литературы

1. Kamran M.Z., Ranjan A., Kaur N. a. an. Radioprotective agents: strategies and translational advances // *Medicinal Res. Reviews*, 2016, v.36, n.3, p. 461-493.

2. Владимиров В.Г., Красильников И.И., Арапов О.В. Радиопротекторы: структура и функция. Киев, Наук. думка, – 1989, 264 с.

3. Красильников И.И., Жаковко Е.Б. Выбор и экспериментальное обоснование некоторых направлений разработки полифункциональных радиозащитных средств. В сб.: Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины. Том 1. СПб, НИИ ВМ, 1998, с. 109-116.

4. Zabbarova I., Kanai A. Target delivery of radioprotective agent to mitochondria // *Mol. Interv.*, 2008, Vol.8., n 6, P. 294-302.

5. Hofer M., Hoferova Z., Falk M. Pharmacological modulation of radiation damage. Does it a chance for other substances than hematopoietic growth factors and cytokines? // *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol.18, 1385 (20 p).

6. Ушаков И.Б., Васин М.В. Лекарственные средства и природные антиоксиданты как компоненты противорадиационных контрмер в космических полетах // *Мед. радиол. и радиац. безопасн.*, 2017, т.62, № 4, с. 66-76.

7. Рождественский Л.М. Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения // *Радиац. биол. Радиоэкол.*, 2017, т.57, № 2, с.117-135.

8. Суринов Б.П., Исаева В.Г., Шарецкий А.Н., Жовтун Л.П. Модификация свойств лекарственных средств воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения // Тез.докл. VII Съезд по радиационным исследованиям, М., 21-24 окт. 2014 г. М., 2014, с. 226.

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ЛИПИДА А НА ФОРМИРОВАНИЕ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ

Е.А. Кузьмина^{1,2}, А.В. Борейко^{1,2}, М. Дубничкова³, Е.В. Ильина¹, Р.А. Кожина^{1,2}, С.И. Тиунчик¹, В.Н. Чаусов¹

¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

²Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

³Университет имени Коменского, Братислава, Словакия

e-mail: evgbelyakova@gmail.com

Резюме. Изучено модифицирующее влияние различных форм липида А (дифосфорила липида А (ДЛА) и монофосфорила липида А (МЛА)) на формирование двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови и в нейронах гиппокампа мышей при облучении γ -квантами ⁶⁰Со. Получены дозовые зависимости линейного типа, свидетельствующие о различном характере модифицирующего влияния использованных препаратов. Установлено защитное действие МЛА и радиосенсибилизирующее влияние ДЛА. Механизмы модифицирующего действия обсуждаются.

Ключевые слова: липополисахариды, липид А, двуниевые разрывы ДНК, ионизирующая радиация

THE MODIFYING INFLUENCES OF LIPID A DERIVATIVES ON GAMMA-IRRADIATION-INDUCED DNA DOUBLE-STRAND BREAKS

Е.А. Kuzmina^{1,2}, А.В. Boreyko^{1,2}, М. Dubničková³, Е.В. Ilina¹, R.A. Kozhina^{1,2}, S.I. Tiunchik¹, V.N. Chausov¹

¹Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

²State University Dubna, Dubna, Russia

³Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia

e-mail: evgbelyakova@gmail.com

Summary. The modifying influence of lipid A (diphosphoryl lipid A (DLA) and monophosphoryl lipid A (MLA)) on DNA double-strand breaks induction in mice lymphocytes and hippocampal neurons of mice under the action of ⁶⁰Co γ -rays is studied. The linear dose dependences were obtained, which indicate of different modifying influence of the used agents. The protective effects of MLA and radiosensitizing influence of DLA are established. Mechanisms of the modifying action are discussed.

Key words: lipopolysaccharides, lipid A, DNA double-strand breaks, ionizing radiation

Модификация радиочувствительности клеток и тканей организма в течение многих лет является одной из актуальных задач радиационной биологии. В последние годы особое внимание привлекают эндотоксины - термически стабильные продукты, присущие только грамотрицательным бактериям и обладающие широким спектром биологической активности. С химической точки зрения эндотоксины представляют собой липополисахариды (ЛПС) и являются основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий, локализованных на их клеточной стенке. Эндотоксическим центром ЛПС является липид А. При низких концентрациях он проявляет высокую биологическую активность и может быть модулятором иммунного ответа [1]. В нашей работе были использованы две различные формы липида А: дифосфорил липида А (ДЛА) и монофосфорил липида А (МЛА). ДЛА представляет собой минимальную токсическую единицу эндотоксина, а МЛА — молекулу,

сохраняющую иммуномодулирующие свойства эндотоксина, однако лишенную его токсических свойств. МЛА получают путем гидролиза нативного ДЛА, при этом сохраняется компонент ЛПС, ответственный за узнавание и связывание с толл-подобными рецепторами (TLR4). Эти структурные изменения МЛА снижают ее токсичность более чем на 99% по сравнению с нативным ДЛА [2].

Целью настоящей работы являлось изучение формирования двунитевых разрывов ДНК (ДР) в различных тканях мышей – нейронах гиппокампа и лимфоцитах при гамма-облучении в условиях влияния различных форм липида А - ДЛА и МЛА.

В качестве объекта исследования были выбраны лимфоциты и нейроны гиппокампа мышей линии C57Bl/6. Модифицирующие агенты МЛА и ДЛА из *E. coli* F583 (Sigma–Aldrich) вводились i.p. в концентрации 50 мкг/кг за 24 ч до облучения. Масса животных составляла 21 – 23 г, возраст составлял 17 недель. Облучение животных γ -квантами ^{60}Co проводили тотально на установке «Рокус-М» (мощность дозы 0,3 Гр/с) в дозах 1, 3 и 5 Гр. После облучения мышей декапитировали. Кровь отбирали в микропробирки с гепарином и помещали на ледяную баню. Лимфоциты выделяли по стандартной методике [3]. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор (154 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , and 0.082 mM EDTA) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Далее суспензию дважды центрифугировали в течение 5 мин при 10°C (300 g). Гомогенизацию нейронов гиппокампа мышей проводили по методике Seibenhener'a [4] с некоторыми модификациями. Извлеченный гиппокамп помещали в сбалансированный буфер Хэнкса (HBSS) ($\text{Mg}[-]$ и $\text{Ca}[-]$), нарезали на мелкие кусочки (1-2 мм³) и заливали раствором коллагеназы (340 Е/мл) в HBSS ($\text{Ca}[+]$, $\text{Mg}[+]$). Далее образцы ткани инкубировали в течение 15 мин при 37°C в CO_2 – термостате. После диссоциации кусочки ткани аккуратно пипетировали до получения однородной клеточной суспензии. Полученную суспензию несколько раз отмывали центрифугированием в HBSS (200 g), к которому была добавлена телячья эмбриональная сыворотка (10% от объема). Исследование молекулярных нарушений в ДНК облученных лимфоцитов и клеток гиппокампа проводили с использованием нейтрального метода ДНК-комет [5]. Для визуализации ДНК-комет использовался флуоресцентный микроскоп AxioScore A1 фирмы Carl Zeiss с CCD-камерой AxioCam ICc3. С каждого слайда регистрировали 100-200 комет.

Получены дозовые зависимости линейного типа, свидетельствующие о различном характере модифицирующего влияния использованных препаратов. Показано, что при действии, как на лимфоциты, так и на нейроны гиппокампа, ДЛА проявляет радиосенсибилизирующие, а МЛА – радиопротекторные свойства. В [2] установлено, что важную роль в формировании повреждений ДНК играет наличие TLR4. Мыши с дефицитом TLR4 были более радиочувствительными. TLR4 рецепторы, связываясь с ЛПС, значительно увеличивают выживаемость животных, облученных в летальных дозах. МЛА активирует сигнальный путь с участием TLR4 рецепторов и фактора NF- κ B, который связан с восстановлением повреждений ДНК. Согласно результатам, полученным в [6], можно предположить, что увеличение количества ДР ДНК в присутствии ДЛА обусловлено его влиянием на TLR4 рецепторы и способностью активировать $\text{I}\kappa\text{B}$, который может оказывать опосредованное воздействие на чувствительность клеток к ионизирующему излучению.

Работа была поддержана грантом Полномочного представителя правительства Словацкой Республики № 04-9-1077-2009/2017

Список литературы

1. Dubničková M, Bukovský M, Mlynářčík D (2003) Activation of human leucocytes by lipid A from *E. coli* strains adapted to quaternary ammonium salt and amine oxide. *Folia Microbiol.* 48: 543–547
2. Jiaming Guo and et al. Monophosphoryl lipid a attenuates radiation injury through TLR4 activation// *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, (No. 49), pp: 86031-86042.
3. Class Reiner Ph.D. Handbook of Flow Cytometry Methods// *American Journal of Clinical Oncology:* February 1995. Volume 18, Issue 1, p 23.
4. M.L. Seibenhener, Wooten M.W. Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice// *J. Vis. Exp.* 2012. *Exp.* (65), e3634.
5. А.В. Борейко Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ / Борейко А.В., Чаусов В.Н., Красавин Е.А., Равначка И., Стукова С.И.// *Письма в ЭЧАЯ.* – 2010. – Т.8. – №4(167). – С. 670-678.
6. Paula M. Chilton, Chelsea A. Embry and Thomas C. Mitchell. Effects of differences in lipid A structure on TLR4 pro-inflammatory signaling and inflammasome activation// *Front Immunol.* 2012. Volume 3, article 154.

МОЖНО ЛИ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЕЙ КОМПЕНСИРОВАТЬ ПОСЛЕДСТВИЯ РАДИАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ?

Куликов А.В., Архипова Л.В., Мндлян Е.Ю., Гаврилюк В.Б., Брусков В.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия,
e-mail: 29.04.55@mail.ru

Резюме. Известно, что в пострadiационный период происходит существенная депрессия иммунной системы. С учётом этого факта разработан экспериментальный трансплантологический метод, приводящий к увеличению выживаемости мышей после воздействия даже летальных доз облучения.

Ключевые слова: облучение, трансплантация, тимус, выживаемость

IS IT POSSIBLE TO COMPENSATE FOR THE CONSEQUENCES OF IRRADIATION BY TRANSPLANTATION OF IMMUNOCOMPETENT TISSUES?

A.V Kulikov, L.V. Arkhipova, E.Yu. Mndlyan, V.B. Gavriilyuk, V.I. Bruskov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, 142290 Russia, e-mail: 29.04.55@mail.ru

Abstract. It is known that, during the postradiation period, a strong depression of the immune system occurs. Based on this fact, an experimental transplantation method has been developed, which increases the survival of mice after the exposure even to lethal radiation doses.

Key words: irradiation, transplantation, thymus, survival

Поиск новых подходов в области противолучевой терапии на фоне интенсивного развития атомной энергетики, ядерного оружия и активизации терроризма, является важной задачей радиобиологии во всём мире. Многочисленные исследования в этой области являются высоко востребованными и актуальными в радиационной и космической медицине, медицине катастроф, онкологии [1, 2, 3].

Поскольку при облучении в больших дозах обычно наиболее значимым звеном патогенеза развития острой лучевой болезни является именно миело- и иммунодепрессия, патогенетически-оправданным 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 [4, 5]. 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 было высказано предположение, что трансплантация иммунокомпетентных тканей даже в неиммунологически привилегированные области может также оказаться эффективной. Кроме того, очевидно, что облучение, в большинстве случаев, сопряжено с выраженным стрессом, который, как известно, также оказывает пагубное влияние на иммунную систему, в частности на Т-клеточное ее звено.

В докладе будут представлены данные по новому методу, позволяющему компенсировать радиационно-индуцированное поражение иммунной системы, что

приводит к увеличению выживаемости экспериментальных животных после воздействия даже летальных доз облучения.

Материалы и методы: Экспериментальные исследования выполнены на 6-7 недельных самцах белых мышей аутбредной линии SHK. Животных массой 25-29 г содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН не более чем по 10 мышей в клетке. Облучение проводили на рентгеновской терапевтической установке “РУТ_15” (“Мосрентген”, Россия). Животных облучали при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 37.5 см, сила тока 20 мА, напряжение 200 кВ). Суммарное облучение 6 Гр.

Трансплантацию ткани тимуса и легкого проводили под общей анестезией (Золетил+Ксилазин), премедикация – атропина сульфат в дозе 0.04 мг/кг подкожно за 15 мин до начала вмешательства. Трансплантацию ткани тимуса и легкого проводили в искусственно созданный «карман» в межлопаточной области. Количество ткани тимуса составило в среднем 48 мг, а ткани легкого (контроль на трансплантационное воздействие) – 51 мг на одно животное. Пересадку иммунокомпетентных клеток тимуса и клеток легкого (напрямую не связанных с иммунологической составляющей), проводили через 3 суток после облучения, когда количество лейкоцитов, лимфоцитов и клеток костного мозга в организме близко к минимальному. Работу с животными проводили согласно рекомендациям Комиссии по биоэтике ИТЭБ РАН.

Результаты и обсуждение

По результатам динамики массы тела, потребления пищи и воды можно прийти к выводам о том, что трансплантация иммунокомпетентных клеток тимуса продуцирующих цитокины и ростовые факторы на фоне пересадки клеток легкого (контроль на трансплантат), приводит к более быстрому восстановлению нормальных значений. В докладе будут представлены графики, подтверждающие данные положения. Наиболее значимым и интересным нам представляются данные выживаемости животных после облучения их в летальной дозе 6 Гр. Как известно, эта доза приводит к 100% гибели мышей в течении 1 месяца. Трансплантация клеток тимуса способствует тому, что 40% животных после облучения в летальной дозе прожили более 30 дней, что более чем в 2 раза превышает среднее время смерти от облучения как в группе облучённых животных в дозе 6 Гр, так и в группе облучённых в дозе 6 Гр с последующей трансплантацией ткани легкого.

Выводы: Трансплантация ткани тимуса может приводить к увеличению выживаемости мышей после летального облучения, только в случае, когда пересадка производится не сразу, а в сроки, когда количество лейкоцитов, лимфоцитов и клеток костного мозга минимально (навязанный иммунодефицит). Если соблюдать указанное правило, то после трансплантации можно не использовать иммунодепрессанты.

Разработанная модель может быть использована для широкого спектра радиобиологических исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН №007-00-94-18-00.

Список литературы

1. Ильин Л.А., Рождественский Л.М., Котеров А.Н., Борисов Н.М. Актуальная радиобиология: курс лекций / М.: Издательский дом МЭИ, 2015. 240 с.
2. Бутомо Н.В., Гребенюк А.Н., Легеза В.И. [и др.] Основы медицинской радиобиологии / под ред. И.Б. Ушакова. СПб: Фолиант, 2004. 384 с.
3. Krasavin E.A. Radiobiological research at JINR's accelerators // PHYS-USP. 2016. Vol. 59. № 4. P. 411–418.

4. Куликов А.В., Куликов Д.А., Маевский Е.И., Наумов А.Д., Петренев Д.Р. Способ компенсации последствий сублетального и летального стрессового воздействия // Сборник статей международной научной конференции «Радиация и Чернобыль: наука и практика». Белорусь, 2011. С. 98–90.

5. Kulikov A.V., Arkhipova L.V., Kulikov D.A., Kulikov P.A. The increase of the average and maximum span of life by the allogenic thymic cells transplantation in the animals' anterior chamber of eye // *Advances in Gerontology*. 2014. Vol. 4. №. 3. С. 197–200.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.Г. Лебедев, Т.А. Насонова, А.В. Лырщикова, Ю.Б. Дешевой, О.А. Добрынина, Б.Б. Мороз

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. e-mail: vgleb468@yandex.ru

Резюме. Исследовали эффективность трансплантации стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани при тяжелых местных радиационных поражениях кожи, вызванных действием рентгеновского излучения. Крыс инбредной линии Wistar-Kyoto облучали локально в области спины в дозе 110 Гр, при мощности дозы 17,34 Гр/мин. Клеточную терапию проводили с использованием различных схем трансплантации, как в ранние, так и в отдаленные сроки после облучения. Показано, что трансплантация СВФ при тяжелых местных радиационных поражениях у крыс способствует стимуляции регенерационных процессов и ускорению заживления лучевых язв кожи.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, стромально-васкулярная фракция, жировая ткань, местные лучевые повреждения.

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF THE STROMAL VASCULAR FRACTION OF FATTY TISSUE IN THE CELLULAR THERAPY OF SEVERE LOCAL RADIATION INJURIES IN EXPERIMENT

V.G. Lebedev, T.A. Nasonova, A.V. Lirschikova, Y.B. Deshevoy, O.A. Dobrynina, B.B. Moroz

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. e-mail: vgleb468@yandex.ru

Summary: The efficiency of transplantation of the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue in severe local radiation damage to the skin caused by X-ray radiation was studied. Rats of the inbred strain Wistar-Kyoto were irradiated locally in the back area at a dose of 110 Gy, at a dose rate of 17.34 Gy/min. Cellular therapy was performed using various transplantation schemes, both in the early and in the long term after irradiation. It has been shown that transplantation of SVF after severe local radiation injuries in rats promotes stimulation of regeneration processes and accelerates the healing of radiation ulcers of the skin.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, stromal vascular fraction, adipose tissue, local radiation damage.

Тяжелые местные лучевые поражения, которые могут возникать при радиационных авариях, а также как осложнения после радиотерапии опухолей, часто характеризуются развитием длительно незаживающих язв на фоне нарушения трофики тканей [1]. Ранее было показано, что перспективным способом лечения местных лучевых поражений является применение клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из костного мозга [2]. В настоящее время альтернативным источником получения ММСК для аутологических трансплантаций является жировая ткань, причем стволовые клетки жировой ткани могут использоваться в виде культивированных ММСК или в виде стромально-васкулярной фракции (СВФ) [3, 4]. СВФ содержит мезенхимальные стволовые клетки, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перициты, фибробласты, клетки крови [5]. Высокая концентрация

ММСК в гетерогенной популяции СВФ позволяет получать необходимое для трансплантации количество стволовых клеток без предварительного культивирования.

Цель исследования: изучение эффективности применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани при различных схемах трансплантации для экспериментальной терапии тяжелых местных радиационных поражений кожи, вызванных действием мягкого рентгеновского излучения.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 230-260 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пушкино). Животные этой линии генетически не отличаются друг от друга, что позволяет проводить трансплантацию без возможного отторжения пересаженных клеток. Крыс подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины на установке ЛНК-268 (РАП 100 – 10) в дозе 110 Гр при мощности дозы 17,34 Гр/мин, напряжении 30 кВ, силе тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al. Клеточную терапию проводили с использованием различных схем трансплантации в относительно ранние сроки, двукратно через 14 и 28 суток, и в отдаленные сроки через 56 и 63 суток после облучения. В каждом эксперименте, при различных схемах введения клеток, была своя контрольная группа животных. Биоматериал для выделения СВФ при каждой трансплантации получали от интактных крыс. Выделение СВФ проводили посредством ферментативной обработки жировой ткани коллагеназой согласно опубликованному ранее методу [6]. После подсчета клеток суспензию разводили в растворе Хенкса и вводили в дозах от $2,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ на крысу, подкожно в 5 точек вокруг лучевой язвы. Наблюдения за облученными животными проводили в течение четырех месяцев после воздействия радиации. Тяжесть течения лучевого поражения кожи и эффективность клеточной терапии оценивали по клиническим изменениям в баллах и с помощью планиметрических методов, позволяющих измерять площадь радиационных поражений кожи в динамике.

Оценка клинических проявлений лучевого поражения показала, что после облучения отмечается короткий латентный период. Затем на 8-10-е сутки в области поражения наблюдались симптомы сухого дерматита. К 14-16-м суткам появлялась экссудация, и сухой дерматит переходил во влажный дерматит. Через 21-25 суток после радиационного воздействия на коже крыс образовывались язвы, покрытые струпом коричневого цвета. Средняя площадь лучевых язв на 22-е сутки после облучения была $2,65 \pm 0,23 \text{ см}^2$.

В контрольной группе животных после образования язв наблюдалось медленное сокращение площади язвенных поверхностей, и у большинства этих крыс язвы сохранялись свыше 120 суток. Площадь лучевых язв на 91-е и 98-е сутки после облучения составляла $1,58 \pm 0,12 \text{ см}^2$ и $1,11 \pm 0,15 \text{ см}^2$, соответственно.

В опытной группе крыс, которым на 14-е и 28-е сутки вводили СВФ, площадь лучевых язв на 91-е и 98-е сутки после облучения уменьшалась на 50-70% по сравнению с контролем, до $0,78 \pm 0,20 \text{ см}^2$ и $0,29 \pm 0,10 \text{ см}^2$, соответственно. Наблюдалось улучшение клинической картины течения поражения. В отличие от животных контрольной группы у леченых крыс не отмечалось нагноения язв. Кроме того, при введении СВФ наблюдалось ускорение рубцевания лучевых язв. Так, на 105-е сутки после облучения у 80 % крыс, которым трансплантировали СВФ, на месте лучевых язв образовались атрофические рубцы, в то время как у контрольных животных в этот период полное заживление язв отмечалось только у 25 % крыс ($p < 0,05$).

В эксперименте с введением СВФ в отдаленные сроки, через 56 и 63 суток после облучения, у контрольных животных после образования язв наблюдалось медленное сокращение площади лучевого повреждения, и у большинства крыс язвы сохранялись

свыше 126 суток после облучения. Площадь лучевых язв на 105-е и 119-е сутки после облучения составляла $1,05 \pm 0,19 \text{ см}^2$ и $0,45 \pm 0,16 \text{ см}^2$, соответственно.

В опытной группе крыс скорость заживления язв была выше, чем в контрольной группе. Площадь лучевых язв составляла $0,58 \pm 0,18 \text{ см}^2$ и $0,12 \pm 0,09 \text{ см}^2$ на 105-е и 119-е сутки после облучения, соответственно. Однако, несмотря на различия величин площади лучевых язв у крыс в контрольной и опытной группах, разница между ними была статистически недостоверной. Следует отметить, что в опытной группе на 105-е сутки после облучения у одной из десяти крыс язва зажила полностью с образованием атрофического рубца, а к 119-м суткам уже у 60 % крыс зарегистрированы атрофические рубцы. В контрольной группе процесс рубцевания начался на неделю позже и к 119 –м суткам только у 20 % животных были атрофические рубцы ($p < 0,05$). Тяжесть клинических проявлений в обеих группах до 105-х суток после облучения была практически одинаковой, и лишь после 105-х суток в опытной группе происходило статистически значимое снижение тяжести клинических проявлений.

Таким образом, полученные экспериментальные данные показывают, что трансплантация клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при тяжелых местных лучевых поражениях кожи у крыс после воздействия рентгеновского излучения способствует ускорению заживления лучевых язв и облегчению течения патологического процесса. Применение СВФ может оказаться целесообразным для совершенствования схемы комплексного лечения тяжелых местных радиационных поражений. Преимуществом использования СВФ в клинике является то, что получение необходимого количества стволовых клеток не требует длительного культивирования, и клеточный продукт может быть подготовлен к применению уже через 3-4 часа после забора ткани. Необходимо дальнейшее накопление экспериментальных данных, которые позволят обосновать оптимальные условия применения клеточной терапии с использованием стволовых клеток жировой ткани, способы и сроки трансплантации в зависимости от степени тяжести радиационного поражения и динамики патологического процесса.

Список литературы.

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения. /под ред. Л.А. Ильина М.: ИздАТ. 2001. Т.2. 432 с.
2. Мороз Б.Б., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г. и др. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения. //Радиационная биология. Радиоэкология. 2009.Т.49, № 6. С. 688-693.
3. Huang S.P., Huang C.H., Shyu J.F. et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. // Journal of Biomedical Science. 2013. V. 20. № 1. P.51-60.
4. Akita S., Yoshimoto H., Ohtsuru A. et al. Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries. //Radiation protection dosimetry. 2012. V. 151. № 4. P. 656-660.
5. Yoshimura K., Suga H., Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation // Regen. Med. 2009. № 4. P. 265-273.
6. Zuk P, Zhu M, Muzuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. Tissue Eng, 2001. V.7. № 2. P.211-218.

КЛАССИФИКАЦИЯ РАДИОМИТИГАТОРОВ – НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

*В.И. Лезега*¹, *А.Н. Гребенюк*^{1,2}, *И.С. Драчев*³, *В.М. Резник*¹

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»,

² ООО «Специальная и Медицинская Техника»,

³ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации,

Санкт-Петербург, Россия

e-mail: grebenyuk_an@mail.ru

Резюме. Предложена классификация радиомитигаторов – нового класса противолучевых средств, предназначенных для предупреждения или снижения выраженности клинических проявлений острого радиационного синдрома и его отсроченных и отдаленных последствий. Приведен перечень наиболее перспективных радиомитигаторов: цитокины, ростовые факторы, антиоксиданты, иммуномодуляторы, аналоги гормонов, блокаторы апоптоза.

Ключевые слова: облучение, острая лучевая болезнь, радиационные синдромы, отдаленные последствия, радиомитигаторы, классификация.

CLASSIFICATION OF RADIOMITIGATORS – A NEW LOOK AT THE PROBLEM

*V.I. Legeza*¹, *A.N. Grebenyuk*^{1,2}, *I.S. Drachev*³, *V.M. Reznik*¹

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy,

² Special & Medical Equipment,

³ State Research Institute of Military Medicine
of the Ministry of Defense of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russia,

e-mail: grebenyuk_an@mail.ru

Summary. Classification of radiomitigators – a new class of radioprotective means designed to prevent or reduce the severity of clinical manifestations of acute radiation syndrome and its delayed and remote consequences is suggested. The list of the most promising radiomitigators, including cytokines, growth factors, antioxidants, immunomodulators, hormone analogues and apoptosis blockers is presented.

Key words: irradiation, acute radiation syndrome, radiation injures, long-term consequences, radiomitigators, classification

Последние годы XX и первые десятилетия XXI века ознаменовались значительными успехами радиационной фармакологии, которые в конечном итоге привели к появлению принципиально нового класса противолучевых средств – радиомитигаторов (от англ. *to mitigate* – смягчать, ослаблять) [1]. До настоящего времени не существует общепринятой классификации этого вида соединений, что и послужило предпосылкой для выполнения настоящей работы.

К радиомитигаторам принято относить химические или биологические препараты, которые будучи введенными в организм до развития клинико-лабораторных признаков лучевого поражения, оказывают лечебно-профилактический эффект. Хотя приоритет в предложении этого термина принадлежит зарубежным исследователям [2], проблема разработки указанных средств, называемых в отечественной литературе «средствами ранней патогенетической терапии острых радиационных поражений», в

течении долгих лет успешно развивалась советскими и российскими специалистами в области радиационной фармакологии [3, 4].

В предлагаемой ниже классификации радиомитигаторы, используемые для профилактики и лечения ближайших и отдаленных клинических проявлений острой лучевой болезни (ОЛБ), подразделены на следующие основные группы:

- средства борьбы с костномозговым синдромом ОЛБ;
- средства борьбы с желудочно-кишечным синдромом ОЛБ;
- средства борьбы с местными и субтотальными проявлениями лучевых поражений;
- средства профилактики и лечения отсроченных и отдаленных последствий ОЛБ.

Среди средств профилактики и лечения лучевого костномозгового синдрома первое место по числу перспективных радиомитигаторов занимают цитокины: гемопоэтические факторы роста – эпоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), пегилированный Г-КСФ, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), тромбopoэтин, фактор стволовых клеток (SCF), фактор деривативных стромальных клеток (SDF), фактор роста кератиноцитов, и интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-11, ИЛ-12) [5]. Некоторые цитокины (анти TNF-антитела, фактор роста фибробластов FGF-P) существенно ослабляют действие радиации на кишечный эпителий, что свидетельствует о перспективности их использовании в качестве средств профилактики и лечения желудочно-кишечного синдрома ОЛБ [5].

Весьма перспективными для использования в качестве радиомитигаторов – средств терапии костномозгового синдрома ОЛБ являются антиоксиданты: производные токола (токодиенол, α -токоферосукцинат), препараты супероксиддисмутазы, изофлавоноид генистеин, производное пиразолона эдаварон, нуклеозиды инозин и гуанозин, препарат из бурых водорослей диэкол и др. [6]. Несмотря на относительно невысокую величину фактора изменения дозы (ФИД = 1,2–1,3) они обладают несомненными преимуществами: хорошей переносимостью даже при курсовом применении и лечебно-профилактическим эффектом.

Третью большую группу радиомитигаторов, перспективных для лечения гемопоэтического синдрома ОЛБ, составляют иммуномодуляторы. Наиболее эффективными из них в настоящее время считаются СВЛВ 502 (препарат из жгутиков *Salmonella enterica* флагеллин), гормональные препараты (5-андростендиол – Neumune, аналог соматостатина SOM230, инсулиноподобный фактор роста IGF-1 и др.), а также ингибиторы апоптоза (каптоприл, фенилбутират, статины, антагонисты белков теплового шока и др.) [7].

В последние годы наметился определенный прогресс в изыскании радиомитигаторов, модифицирующих выживаемость животных, облученных в дозах, вызывающих развитие гастроинтестинального синдрома ОЛБ. К числу таких препаратов относятся аналог соматостатина SOM230, бекламетазона дипропионат (Orbeshield), пентоксифиллин, антицерамидные и анти TNF-антитела [7].

При неравномерных радиационных воздействиях с большим перепадом дозы или локальном высокодозном облучении могут возникать поражения кожи и слизистых оболочек (мукозиты), легких (пульмониты), энтеропатии. В настоящее время разработаны радиомитигаторы для борьбы с этими отсроченными проявлениями ОЛБ — фактор роста фибробластов (FGF-P), палифермин, АЕОЛ-10150 и др. [7]. Весьма перспективными средствами профилактики и лечения отсроченных эффектов, обусловленных радиационным поражением, являются агонисты ИЛ-10 (теновил,

декавил, ребоксетин, идазоксан), антагонисты ИЛ-6 (тоцилизумад, байкалеин, правастатин) и ингибиторы АПФ (каптоприл, диалаприл, периндоприл).

Определенные успехи достигнуты и в решении такой сложной проблемы как профилактика и лечение отдаленных детерминистских последствий облучения – фиброзов. В частности, при использовании в качестве антифиброзных средств показана эффективность (в эксперименте) ингибиторов TNF (декавила, инфликсимаба), ингибиторов эндотелиального роста сосудов VEGF (ваталаниба, паропаниба, цедираниба), ингибиторов трансформирующего фактора роста TGF- β (релаксина, наринженина, перфинидона), ингибитора фактора роста тромбоцитов PDGF (иматиниба) и агониста фактора роста гепатоцитов HGF (ретиноевой кислоты) [7].

Наконец, определенный прогресс наметился в исследованиях по проблеме профилактики отдаленных стохастических эффектов облучения, обусловленных радиационно-индуцированным мутагенезом, – лейкозов и солидных опухолей. В экспериментальных исследованиях установлено, что такие радиомитигаторы как авотермин (стимулятор TGF), линдан (ингибитор коннектинов), ретвератрол (стимулятор экспрессии сиртуинов) существенно снижают риск опухолевой трансформации органов и тканей, облученных в высоких дозах.

Представленные материалы свидетельствуют, что радиомитигаторы в настоящее время являются одним из наиболее перспективных классов средств профилактики и терапии радиационных поражений, развивающихся после облучения в широком диапазоне доз, так как они способны оказать модифицирующее действие как на ближайшие, так и на отсроченные, а также отдаленные эффекты лучевого воздействия.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н., Легеза В.И., Тарумов Р.А. Радиомитигаторы: перспективы использования в системе медицинской противорадиационной защиты // Воен.-мед. журн. 2014. Т. 335, № 6. С. 39–43.
2. Xiao M. Whitnall M.H. Pharmacological countermeasures for the acute radiation syndrome // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 2, № 1. P. 122–133.
3. Легеза В.И., Чigareва Н.Г. Средства и методы ранней патогенетической терапии радиационных поражений // *Медицина катастроф.* 1999. № 2. С. 41–45.
4. Васин М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // *Радиационная биология и радиационная экология.* 2013. Т. 53, № 5. С. 459–467.
5. Koukourakis M.I. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine // *Br. J. Radiol.* 2012. Vol. 85. P. 313–330.
6. Singh V.K., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: Part I. Radiation subsyndromes, animal models and FDA-approved countermeasures // *Int. J. Rad. Biol.* 2017. Vol. 93, № 9. P. 851–869.
7. Singh V.K., Hanlon B.K., Santiago P.T., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: Part III. Countermeasures under early stages of development along with ‘standard of care’ medicinal and procedures not requiring regulatory approval for use // *Int. J. Rad. Biol.* 2017. Vol. 93, № 9. P. 885–906.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПЕПТИДА «СЕМАКС» ПРИ ЛУЧЕВОЙ ПАТОЛОГИИ

*К.Н. Ляхова¹, И.А. Колесникова¹, Ю.С. Северюхин¹, Д.М. Утина¹, А.А. Иванов¹,
Н.Н. Буденная¹, А.Г. Молоканов¹, Е.А. Красавин¹*

¹ Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия,
e-mail: lyakhovakn@mail.ru

Резюме. Изучено влияние препарата «Семакс» на показатели поведенческой реакции, иммуногематологического статуса, силы скелетной мускулатуры и морфологические изменения нейронов головного мозга мышей при действии протонов высоких энергий. Применение Семакса уменьшает негативное влияние облучения на показатели поведенческой реакции и силы скелетной мускулатуры мышей. Морфологическая картина в сенсомоторной коре облученных животных с использованием Семакса, соответствовала нормальной у необлученных животных. Наблюдается положительный эффект препарата на капилляры и сосуды сенсомоторной коры.

Ключевые слова: Семакс, показатели поведенческой реакции, сила скелетной мускулатуры, нейроны, клетки Пуркинье, кора головного мозга, сосуды

RESULTS OF PRECLINICAL RESEARCHES OF THE NEUROPEPTID "SEMEX" AT RADIATION PATHOLOGY

*K.N. Lyakhova¹, I.A. Kolesnikova¹, Yu.S. Severiukhin¹, D.M. Utina¹, A.A. Ivanov¹, N.N.
Budennaya¹, A.G. Molokanov¹*

¹Joint Institute of Nuclear Research, Dubna, Russia, e-mail: lyakhovakn@mail.ru

Summary. Influence of the medicine "Semaks" on indicators of behavioural reaction, the immunohematological status, grip strength of the skeletal muscles and morphological changes of neurones of a brain of mice irradiated with protons of high energies is studied. The medicine reduces negative impact of radiation on indicators of behavioural reaction and grip strength of the skeletal muscles of mice. The morphological picture in sensorimotor area of the cerebral cortex of the irradiated animals with Semaks's use, corresponded normal at unirradiated animals. The positive effect of medicine on capillaries and vessels of sensorimotor area of the cerebral cortex is observed.

Key words: Semaks, indicators of behavioural reaction, grip strength of the skeletal muscles, neurons, Purkinje cells, the cerebral cortex, cerebral vessels.

Проведено доклиническое изучение свойств препарата «Семакс», который, предполагается, способен специфически купировать радиационные нарушения в центральной нервной системе (ЦНС).

Цель настоящего исследования - оценка влияния официального препарата Семакс (капли назальные 0,1%) на поведенческие реакции, иммуногематологический статус и силу захвата передних лап мышей, морфологические нарушения в нервной ткани, облученных протонами с энергией 170 МэВ в дозах 2,28 и 2,85 Гр

Материалы и методы. Исследования выполнены на самках аутбредных мышей ICR (CD-1), SPF-категории. Животных облучали на фазотроне ОИЯИ протонами с начальной энергией 170 МэВ при толщине дополнительного замедлителя 190 мм. Дозы облучения составляли 2,28 и 2,85 Гр в точке облучения, т.е. на тело мыши. После облучения животных распределяли на две рандомизированные по массе группы, одна из которых (основная), получала препарат Семакс 0,1% (по 1 капле интраназально, начиная со второго часа после облучения), трижды в сутки: утром, днем и вечером в

течение 7 суток. Второй группе облученных животных вводили кипяченую охлажденную воду по аналогичной схеме. Влияние облучения протонами на поведенческие реакции животных оценивали по уровню локомоторной активности в тестовой установке «Открытом поле» (ОП) [1]. В течение 3 мин учитывали акты пересечения секторов, проходы через центр, подъем, норковый рефлекс. Сумма этих актов составила показатель ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР), а акты груминг, замирание, движение на месте – показатель эмоционального статуса (ЭС). Силу скелетной мускулатуры мышц оценивали по показателю силы захвата (в граммах) передних лап животного на электронном динамометре. В исследовании была использована общепринятая методика подсчета числа кариоцитов в костном мозге бедренной кости и числа лейкоцитов в периферической крови в камере Горяева [2]. Массу тимуса и селезенки определяли на электронных весах Ohaus с ценой деления 1 мг. После декапитации (на 8 сутки) биологический материал для гистологического исследования фиксировали в растворе Карнуа. Обработка головного мозга мышей и приготовление препаратов проходила в соответствии со стандартной гистологической техникой. Препараты окрашивали крезил-виолетом по методу Ниссля [3]. Для количественной оценки данных определяли процентное соотношение нейронов без видимых изменений, нейронов с обратимыми морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными признаками и нейронов с дистрофическими изменениями. Статистическую значимость рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Облучение мышей протонами вызывает статистически значимое поражение системы кроветворения и иммунитета. Интраназальное введение облученным животным ноотропного препарата Семакс не отягощало, по большинству исследованных традиционных радиобиологических показателей (масса тимуса и селезенки, число кариоцитов в костном мозге и число лейкоцитов в периферической крови), тяжести лучевого поражения. Препарат при многократном интраназальном введении статистически значимо влияет на сохранность показателя ОИР, нарушенной у облученных животных при дозе 2,85 Гр. Препарат нормализует показатель ЭС на 7 сутки после воздействия использованных доз облучения. Облучение в использованных дозах снижает величину силы скелетной мускулатуры мышей до 81,3-84,6 % от уровня группы контрольных животных. Применение Семакса восстанавливает уровень данного показателя до 93,1-100 %, поднимая его до значений, присущих контрольной группе. Установлено, что морфологическая картина в сенсомоторной коре головного мозга облученных животных, леченных с использованием Семакса, соответствовала нормальной у необлученных животных. Положительного эффекта препарата в клетках Пуркинью мозжечка не обнаружено. В коре головного мозга у облученных животных, леченых Семаксом, практически отсутствуют радиационные нарушения капилляров.

Обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии препарата на показатели поведенческой исследовательской реакции и силу скелетной мускулатуры у мышей при действии протонов высоких энергий. Следует заметить, что экспериментальных исследований о влиянии использованного препарата на неврологический статус животных при действии ионизирующей радиации мы не встретили. Однако на позитивное влияние препарата при радиационном воздействии указывают данные клинических исследований. Эти результаты свидетельствуют о положительном эффекте данного нейропептида при разных сценариях лучевого воздействия на организм. Использование Семакса в составе комплексной терапии пожилых пациентов, имевших в отдаленном анамнезе (нескольких лет) контакт с ионизирующим излучением, вызывало благоприятный нейрофизиологический эффект.

На фоне проведения комплексной терапии и приема Семакса у лиц, спустя 7 лет после участия в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС, отмечено исчезновение вялости, снижение психической и физической утомляемости, улучшение настроения, внимания, памяти, умственной работоспособности [4]. Положительное действие Семакса на гемодинамику головного мозга, на умственную работоспособность и другие показатели психофизиологического статуса отмечено при реабилитации ветеранов подразделений особого риска через 20-40 лет после участия в ликвидации радиационных аварий [5]. Результаты позволяют сделать вывод о том, что использованный нейропептид оказывает благоприятное влияние на реализацию высших интегративных функций ЦНС у грызунов при действии ускоренных заряженных частиц - протонов высоких энергий. Это обстоятельство дает основания для дальнейшего изучения влияния данного препарата на поведенческие и когнитивные реакции животных при действии более тяжёлых заряженных частиц, например, ионов углерода. Наряду с этим, можно считать перспективными исследования других фармакохимических средств для купирования негативного влияния ускоренных тяжёлых ионов на структуры и функции центральной нервной системы. Необходимость такого рода исследований обусловлена важными практическими задачами, стоящими перед космической радиобиологией, радиационной медициной и такие работы планируются нами в дальнейшем. Облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 2,85 Гр оказывает негативное влияние на состояние нейронов головного мозга мышей, что подтверждают статистически значимые данные сравнительного количественного морфологического анализа: показатель дистрофически-измененных нейронов существенно выше, чем у необлученных животных. В сенсомоторной коре головного мозга облученных животных, которым интраназально вводили препарат Семакс после облучения, соответствовала нормальной у необлученных животных, в сравнении с группой облученных животных, не получавших препарат Семакс. Противолучевое действие Семакса по результатам исследования клеток Пуркинье мозжечка не установлено. В коре головного мозга у облученных животных, получавших Семакс, практически отсутствуют нарушения структуры капилляров.

Нейропептид «Семакс» оказывает благоприятное влияние на реализацию высших интегративных функций ЦНС и силу скелетной мускулатуры у грызунов при действии ускоренных заряженных частиц - протонов высоких энергий.

Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Наука, 1992 г. – с. 250.
2. Mantz J.M. Method for the quantitative examination of the bone marrow of white rats // C.R. Seances Soc. Biol. Fil. 1957. V. 151. № 11. P. 1957-1960.
3. Буденная Н.Н., Федоренко Б.С., Петров В.М. Методика определения цитоморфологических изменений в нейронах головного мозга и внутренних органов лабораторных животных №I – I04 – 7 – 92, P. 1-9, 1992г.
4. Андреева Л.А., Ашмарин И. П. Ноотропное средство и фармацевтическая композиция ноотропного действия. Патент на изобретение RU №2045958 опубликовано: 20.10.1995.
5. Пучкова Е.И., Алишев Н.В. Исследование лечебных свойств препарата «Семакс» при реабилитации ветеранов подразделений особого риска. Успехи геронтологии, 2012, т.25, №3, с. 525-530.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СВОЙСТВ NOS-ИНГИБИТОРА T1023 ПРИ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕКСАМИНОМ

В.М. Макаrchук, М.В. Филимонова, Л.И.Шевченко,

А.С. Филимонов, В.И. Суринова,

Е.А. Чеснакова, А.С. Самсонова, Т.С. Корнеева, О.С. Измestьева, А.А. Лычагин

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия,

e-mail: amnea@mail.ru

Резюме. В экспериментах на мышах показана способность оригинального NOS-ингибитора T1023 повышать противолучевую эффективность мексамина. Важно, что соединение T1023 не оказывало влияние на острую токсичность мексамина. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки фармацевтических композиций NOS-ингибиторов с другими вазоактивными радиопротекторами, оптимальных как с точки зрения противолучевой эффективности, так и безопасности.

Ключевые слова: облучение, костномозговой синдром, NOS-ингибиторы, гипоксические радиопротекторы, токсичность.

STUDY OF RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF NOS-INHIBITOR T1023 IN PHARMACODYNAMIC INTERACTION WITH MEXAMINE

V.M. Makarchuk, M.V. Filimonova, L.I. Shevchenko, A.S. Filimonov, V.I. Surinova,

E.A. Chesnakova, A.S. Samsonova, T.S. Korneeva, O.S. Izmestieva, A.A. Lychagin

A. Tsyb Medical Radiological Research Center –

branch of the NMRC of radiology of MH RF, Obninsk, Russia,

e-mail: amnea@mail.ru

Summary. In experiments on mice there was shown an ability of the original NOS-inhibitor T1023 to enhance the radioprotective effectiveness of mexamine. It is important, that compound T1023 did not affect the acute toxicity of mexamine. The obtained results are suggested to be perspective for development of pharmaceutical compositions of NOS-inhibitors with other vasoactive radioprotectors, optimal both from the point of view of radioprotection effectiveness and safety.

Key words: irradiation, bone marrow syndrome, NOS-inhibitors, hypoxic radioprotectors, toxicity.

В настоящее время в условиях постоянного расширения объёмов использования источников ионизирующего излучения в различных сферах жизнедеятельности человека проблема разработки новых эффективных и безопасных противолучевых средств является одной из приоритетных. Показанное в последние годы активное участие эндогенного оксида азота (NO) в биологических процессах, определяющих радиочувствительность организма, позволяет рассматривать ингибиторы синтазы NO (NOS-ингибиторы) в качестве соединений, перспективных для поиска средств повышения радиорезистентности [1-5]. В лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России в ряду оригинальных N,S-замещённых производных изотиомочевины выявлено соединение T1023, являющееся обратимым, субстрат-подобным NOS-ингибитором, проявляющим выраженную радиозащитную эффективность. В наших исследованиях также была выявлена способность соединения T1023 к синергическому взаимодействию с

серотонин- и адренергическими радиопротекторами, обладающими как и NOS-ингибиторы гипоксическим механизмом противолучевого действия [6-7].

Целью данной работы было изучение противолучевых свойств NOS-ингибитора T1023 при фармакодинамическом взаимодействии с радиопротектором экстренного действия мексamiном.

Материалы и методы. Исследования выполнены на самцах мышей-гибридов F₁ (СВА×С₅₇ВL_{6j}) в возрасте 2,5-3 месяца с исходной массой тела 24-26 г. Животных подвергали воздействию гамма-излучения ⁶⁰Со с мощностью дозы 10 мГр/с. Исследуемые вещества вводили путём внутривентральных инъекций, соединение T1023 – за 30 мин, мексамин – за 10 мин до лучевого воздействия. Противолучевые эффекты оценивали по тестам селезёночного эндо- и экзогенного колониеобразования и тесту 30-суточной выживаемости облучённых животных. Оценку влияния радиомодифицирующей дозы соединения T1023 на токсичность мексамина проводили с помощью методов Прозоровского В.Б. и Литчфилда-Уилкоксона.

Результаты. С помощью теста селезёночных эндоколоний при воздействии гамма-излучения в дозе 6 Гр была показана способность соединения T1023 резко повышать противолучевую эффективность мексамина. Наиболее оптимальным, на наш взгляд, представляется сочетание соединения T1023 в дозе 25 мг/кг (1/12 от ЛД₁₆), при которой оно самостоятельно не обладает противолучевым действием, и мексамина в минимальной радиозащитной дозе 5 мг/кг. В этом случае выживаемость эндогенных КОЕ-С-8 повысилась в 8,2 раза по сравнению с контролем облучения и в 2 раза по сравнению с животными, получавшими мексамин в оптимальной радиозащитной дозе 20 мг/кг.

При применении выбранной комбинации соединения T1023 и мексамина наблюдалось выраженное повышение противолучевой эффективности в отношении выживаемости и экзогенных КОЕ-С-8. ФИД по этому параметру достигал значения 3,02 (2,12÷4,11), коэффициент синергизма составил 2,14 (1,34÷3,39). Способность исследуемой комбинации эффективно защищать кроветворную систему облучённых животных позволила на 100% защитить от гибели мышей, облучённых в абсолютно летальной дозе 9 Гр. ФИД для комбинации T1023 в дозе 25 мг/кг и мексамина в дозе 5 мг/кг при определении с помощью теста 30-суточной выживаемости составил 1,73 (1,53 ÷ 1,95).

Кроме того, было изучено влияние T1023 в радиомодифицирующей дозе 25 мг/кг и на острую токсичность мексамина. В этом случае инъекции T1023 осуществляли за 20 мин до введения мексамина в токсических дозах. В независимых экспериментах показано, что T1023 не влияет на острую токсичность мексамина. Но в то же время введение T1023 перед инъекциями токсических доз мексамина сопровождалось выраженным нарастанием гипоксии (потемнение глазных яблок, слизистых оболочек и кожного покрова), не наблюдавшимся у животных, получавших мексамин в эквивалентных дозах изолированно. Такие внешние проявления особенностей взаимодействия T1023 и мексамина позволяют предполагать о влиянии NOS-ингибитора на объём, степень выраженности и, судя по всему, механизмы гипоксического действия мексамина. Причём при изолированном применении соединения T1023 в дозе 25 мг/кг не способно вызывать развитие гипоксии и оказывать противолучевое действие.

Выводы. Способность соединения T1023 в малых дозах к синергическому взаимодействию с мексamiном расширяет фармакологические перспективы ингибиторов NOS и представляет практический интерес для дальнейшего изучения, поскольку открывает новые возможности в разработке эффективных и безопасных фармакологических средств противолучевой защиты.

Список литературы

1. Groschner, L.N. Endothelial mitochondria – less respiration, more integration / L.N. Groschner, M.W. Weiermair, R. Malli et al. // *Pflugers Arch.* – 2012. – V. 464, № 1. – P. 63–76.
2. Hernandez, G. Microcirculation in sepsis: new perspectives / G. Hernandez, A. Bruhn, C. Ince // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2013. – V. 11, № 2. – P. 161–169.
3. Michurina, T. Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity / T. Michurina, P. Krasnov, A. Balaz et al. // *Mol. Ther.* – 2004. – V. 10, № 2. – P. 241–248.
4. Olson, S.Y., Garban H.J. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide.* – 2008. – V. 19, № 2. – P. 170–176.
5. Steinert, J.R. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia / J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe // *Neuroscientist.* – 2010. – V. 16, № 4. – P. 435–452.
6. Филимонова, М.В. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами / М.В. Филимонова, Л.И. Шевченко, В.М. Макаручук и др. // *Радиационная биология. Радиационная экология.* – 2015. – Т. 55, № 3. – С.250–259.
7. Филимонова, М.В. К вопросу о механизме радиозащитного действия ингибиторов NO-синтаз / М.В. Филимонова, Л.И. Шевченко, Т.П. Трофимова и др. // *Радиационная биология. Радиационная экология.* – 2014. – Т. 54, №5. – С.500–506.

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЛАГЕЛЛИНА И ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 БЕТА ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

*Е.В. Мурзина*¹, *Г.А. Софронов*^{1,2}, *Н.В. Аксенова*¹, *А.С. Симбирцев*^{2,3}, *О.М. Веселова*¹
¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, ² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ³ ФГУП «ГосНИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В экспериментах на белых беспородных мышах изучено радиозащитное действие рекомбинантных флагеллина и интерлейкина-1 бета, примененных комплексно в разные сроки по отношению к рентгеновскому воздействию. Показано, что наиболее эффективно одновременное введение препаратов животным за 15-30 мин до облучения, которое повышало 30-суточную выживаемость мышей до 100% (в контрольной группе выжило 53% мышей, $p < 0,01$), что свидетельствует о перспективности комбинированного применения данных препаратов.

Ключевые слова: флагеллин, интерлейкин 1 бета, комбинация препаратов, облучение, выживаемость

COMBINED USE OF RECOMBINANT FLAGELLIN AND INTERLEUKIN-1 BETA IN RADIATION EXPOSURE

*E.V. Murzina*¹, *G.A. Sofronov*^{1,2}, *N.V. Aksenova*¹, *A.S. Simbirtsev*^{2,3}, *O.M. Veselova*¹
¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, ² Institute of Experimental Medicine, ³ Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Summary. In experiments on mice the radioprotective effect of recombinant flagellin and interleukin-1 beta was studied. The drugs were used together at different times to the X-ray exposure. The most effective was the simultaneous introduction of drugs for 15-30 minutes before irradiation. 30-day survival rate of mice was 100%, in the control group 53% irradiated mice survived ($p < 0.01$). The obtained results confirm the promise of using a combination of the drugs.

Key words: flagellin, interleukin-1 beta, combination of drugs, irradiation, survival rate

Активные поиски эффективных средств химической защиты организма от воздействия ионизирующих излучений, необходимость которых определяется не только сохраняющейся, но и все возрастающей угрозой возникновения ядерных инцидентов разного масштаба, продолжаются в течение многих десятилетий. Тем не менее, несмотря на огромное разнообразие исследованных препаратов и предложенных к использованию в качестве средств профилактики или терапии радиационных поражений, ни один из них в полной мере не отвечает предъявляемым к данному классу соединений требованиям. В последние годы считается перспективным подход, направленный на комплексное применение радиозащитных средств, обладающих разными механизмами действия, что, как предполагается, позволит более эффективно воздействовать на разные звенья патогенеза лучевых повреждений [1, 2, 3].

Цель исследования: экспериментальная оценка радиозащитной эффективности рекомбинантных флагеллина и интерлейкина-1 бета при сочетанном применении в разных схемах.

Материалы и методы исследования. В работе использовали препараты, синтезированные генно-инженерными методами в Государственном НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России (Санкт-Петербург) – флагеллин бактерий *Salmonella Typhimurium* (рФЛ) и интерлейкин-1 бета человека (ИЛ-1β).

Радиозащитная эффективность препаратов была изучена в модельных экспериментах на половозрелых белых беспородных мышах-самцах (массой тела 21–23 г), выращенных в питомнике лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Облучение животных проводили на рентгенотерапевтической установке «РУМ-17» в направлении «спина – грудь» с кожно-фокусным расстоянием 50 см и мощностью дозы 0,2 мА/кг (38,4 Р/мин). Препараты вводили внутривентриально в дозах: рФЛ – 1 мг/кг, ИЛ-1 β – 50 мкг/кг; поглощенная доза излучения составляла 7,5 Гр.

Анализ выживаемости облученных мышей за 30-суточный период наблюдения проводили по методу Каплана-Мейера. Для сравнения выживаемости мышей в подопытных и контрольных группах использовали критерий Лог-Ранка, средней продолжительности жизни погибших от облучения животных (СПЖ) – критерий Гехана-Вилкоксона. Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statistica 8,0.

Результаты исследования и их обсуждение. Для изучения противолучевого действия исследуемых препаратов при их комплексном применении было сформировано 6 групп животных (по 14-15 особей в каждой). Животным 1-й группы рФЛ вводили за 15-30 мин, ИЛ-1 β через 15-30 мин после радиационного воздействия, 2-й и 3-й групп – одновременно рФЛ и ИЛ-1 β , за 15-30 мин до облучения или через 15-30 мин после, соответственно. Контрольные группы – облучение без применения препаратов и облучение с профилактическим введением рФЛ или с введением ИЛ-1 β в ранние сроки после облучения.

Выживаемость животных контрольной группы «облучение» за 30-суточный период наблюдения составила 53,3 \pm 12,9%, СПЖ – 12 (8; 15) суток. Однократное применение ИЛ-1 β через 15-30 мин после воздействия повышало долю выживших животных до 92,8%, применение рФЛ за 15-30 мин до облучения – до 85,7% (соответственно, $p=0,015$ и $0,044$ по сравнению с контролем). При комплексном применении рФЛ и ИЛ-1 β наибольшую эффективность оказывало одновременное введение препаратов в профилактических целях, обеспечивающее 100%-ную выживаемость облученных животных ($p=0,003$), в то время как после пострadiационного введения рФЛ и ИЛ-1 β выжило 80% мышей. Эффективность применения препаратов в разные сроки (рФЛ до радиационного воздействия, ИЛ-1 β – после) по показателю 30-суточной выживаемости составила 92,8% ($p=0,021$).

Таким образом, использование рФЛ и ИЛ-1 β в комбинации значительно повышало выживаемость облученных мышей во всех изученных схемах, но наиболее эффективно при их одновременном введении за 15-30 мин до облучения.

Противолучевые свойства рекомбинантного провоспалительного цитокина ИЛ-1 β достаточно хорошо изучены в экспериментах на разных видах лабораторных животных многими исследователями и обобщены в монографии [4]. Известно, что при профилактическом и раннем терапевтическом применении препарата повышается радиорезистентность гемопоэтических стволовых клеток, активируется их пролиферативная активность, происходит стимуляция костномозгового кроветворения синтеза других эндогенных цитокинов, перестройка иммунопоэза.

Флагеллин, основной структурный компонент жгутиков бактерий, являющийся мощным активатором врожденного и приобретенного иммунного ответа, изучается в качестве потенциального радиозащитного средства относительно недавно. Механизмы его противолучевого действия до конца не ясны, однако в настоящее время известно, что они опосредуются стимуляцией TLR5-зависимого сигнального пути, приводящего к активации ядерного фактора транскрипции каппа В (NF- κ B), регулирующего экспрессию генов многих цитокинов, факторов роста, белков с антиоксидантными свойствами и ингибиторов апоптоза.

В США разработан и исследуется препарат, представляющий собой фармакологически оптимизированное производное флагеллина (коммерческое название «энтолимод»), обладающий радиопротекторными и радиомитигаторными свойствами [5]. По мнению разработчиков (компания Cleveland BioLabs), препарат может быть эффективен как при воздействии высоких доз ионизирующего излучения, так и в качестве средства снижения тяжести побочных эффектов лучевой терапии онкологических больных.

Ранее было показано, что синтезированный отечественными специалистами рФЛ при его профилактическом введении в короткие сроки до облучения существенно повышает выживаемость подвергнутых воздействию летальных доз рентгеновского излучения мышей [6].

Вывод. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности применения комбинации рФЛ и ИЛ-1 β , которое может способствовать усилению радиозащитного эффекта обоих препаратов, возможно даже при использовании более низких доз, что позволит снизить риск возникновения нежелательных побочных эффектов.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н., Зацепин В.В., Власенко Т.Н. [и др.] Влияние последовательного применения препарата Б-190 и интерлейкина-1 β на выживаемость и костномозговое кроветворение облученных мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 4. С. 475-480.

2. Гребенюк А.Н., Быков В.Н., Мясников В.А. [и др.] Экспериментальная оценка токсичности и радиозащитной эффективности β -эстрадиола и цистамина при их изолированном и совместном применении // Вестник Рос. Воен.-мед. акад. 2012. Т. 39, № 3. С. 168-172.

3. Day R.M., Davis T.A., Barshishat-Kupper M. [et al.] Enhanced hematopoietic protection from radiation by the combination of genistein and captopril // Int. Immunopharmacol. 2013. Vol. 15, № 2. P. 348-356.

4. Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб: Издательство Фолиант, 2012. 216 с.

5. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C. [et al.] An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models // Science. 2008. Vol. 320, № 5873. P. 226-230.

6. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В. [и др.] Экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина // Вестн. Рос. Воен.-мед. акад. 2017. Т. 59, № 3. С. 122-128.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА (ИС) ПЕРСОНАЛА ГОРНО-ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА (ГХК) В УСЛОВИЯХ КОНТАКТА С ХИМИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ (ХФ) ПРОФВРЕДНОСТИ (ПВ)

Орадовская И.В., Васильев А.А., Феоктистов В.В., Никонова М.Ф., Викулов Г.Х.,
ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России. Москва, Россия.
e-mail: oradovskaya.39@mail.ru

Резюме. Представлен анализ результатов иммунологического мониторинга за персоналом ГХК (n=765), одним из факторов профвредности (ПВ) у которого является химический. Анализ проведен в сопоставлении с населением г. Железногорск (n=227), не работающего на ГХК, но проживающего в зоне возможного влияния факторов ПВ. Показаны изменения в иммунном статусе у персонала при наличии и отсутствии влияния конкретных факторов и изменения у населения, косвенно подверженного их воздействию. Выявлен схожий характер реагирования иммунной системы в условиях возможного косвенного влияния ХФ. Данные о влиянии ХФ на состояние иммунитета позволяют обосновать значимость проведения персонализированных превентивных мероприятий по улучшению условий труда и сохранению трудового потенциала.

Ключевые слова: химический фактор, персонал, население, иммунный статус.

FEATURES OF THE CHANGES OF IMMUNE STATUS (IS) STAFF MINING AND CHEMICAL COMBINE (GChK) IN CONTACT WITH CHEMICAL FACTORS (HF) PROFVREDNOSTI (PV)

Oradovskaya I.V., Vasiliev A.A., Feoktistov V.V., Nikonova M.F., Viculov, G.Kh.,
Federal state budgetary the establishment of the "State scientific center Institute of Immunology" of the Federal physician of biological agency, Russia, Moscow;
e-mail: oradovskaya.39@mail.ru

Summary. The analysis of results of immunological monitoring of personnel of GChK (n=765), one of factors of professional harm (PH) at which is chemical, is submitted. The analysis is carried out in comparison to the population Zheleznogorsk (n=227), the possible influence of factors of PH which isn't working for GChK, but living in a zone. Changes in the immune status at personnel at existence and lack of influence of concrete factors are shown and changes at the population indirectly subject to their influence. The similar nature of reaction of immune system in the conditions of possible indirect influence of HF is revealed. Data on influence of HF on a condition of immunity allow to prove the importance of holding the personalized preventive actions for improvement of working conditions and maintaining health and labor potential.

Key words: chemical factor, personnel, population, immune status

Иммунная система является индикатором влияния неблагоприятных факторов на организм человека. В силу этой особенности изменения в иммунном статусе (ИС) могут служить отражением их воздействия. Как правило, производственные факторы действуют на организм не изолированно, а в комплексе при их различных сочетаниях и не всегда возможно выявить преобладающий. Хроническое пролонгированное влияние ХФ ПВ может приводить к развитию иммунной дисфункции и дисбаланса, в связи с чем, оценка ИС может быть одним из методов, характеризующих возникающие в организме изменения в результате воздействия негативных производственных факторов.

Проанализированы результаты иммунологического мониторинга за персоналом ГХК (n=765), одним из факторов ПВ у которого является ХФ, в сопоставлении с

населением г. Железногорск (n=227), не работающего на ГХК, но проживающего в зоне возможного влияния факторов ПВ, имеющих место на комбинате. Среди ХФ ПВ наибольший удельный вес имели соединения азота, углеводороды ароматические, хлорорганические соединения, оксид углерода, оксиды азота, аэрозоли металлов, сварочные аэрозоли, углеводороды алифатические, кислоты, гидразин и его производные, абразивные соединения. Выявлены особенности изменений и различия в ИС персонала при наличии и отсутствии контакта с ХФ и с населением, проживающим в районе размещения и деятельности комбината. Для персонала химических производств характерно хроническое воздействие на организм различных кислот и щелочей, что способствует возникновению патологических процессов, затрагивающих слизистые оболочки органов дыхания, пищеварения, глаз и кожные покровы [1; 3].

В условиях контакта с неорганическими соединениями азота различия в ИС персонала при наличии и отсутствии контакта определялись по показателям индекса иммунорегуляции и уровню сывороточного IgM, которые достоверно ниже были при наличии контакта. По сравнению с населением города достоверно ниже процентное содержание CD3⁺-Т-лимфоцитов, относительные и абсолютные значения CD4⁺-Т-лимфоцитов, индекса CD4⁺/CD8⁺ и повышение цитотоксических CD8⁺-, CD16⁺-лимфоцитов. В системе гуморального звена ИС определялось достоверное снижение сывороточных IgM и IgG и повышение общего IgE, в фагоцитарном звене – повышение ФЧН и снижение ФЧМ при опсонизации IgG.

Более выраженными были различия при наличии контакта с *азотной кислотой*. По сравнению с населением у персонала выявлена недостаточность Т-клеточного звена (CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺) при повышении CD16⁺-клеток (%) и изменении показателей фагоцитоза – ↑ ФЧН и ↓ ФЧМ при опсонизации IgG и снижение естественной ФАМ. В гуморальном звене ИС – снижение сывороточного IgG и повышение общего IgE при наличии контакта. Азотная кислота, как и другие неорганические соединения азота, являются достаточно распространенными токсикантами, с которыми контактирует персонал ГХК, и оказывают выраженное раздражающее влияние на дыхательные пути

Наличие контакта с оксидами азота приводило к снижению IgM, IgG и повышению активированных Т-лимфоцитов, что определяло отличия по отношению к ИС с отсутствием контакта. В сопоставлении с населением у персонала ГХК выявлено снижение процентного содержания CD4⁺-Т-лимфоцитов, индекса CD4⁺/CD8⁺, ФЧМ при опсонизации IgG, а также повышение цитотоксических клеток CD16⁺-лимфоцитов и маркера HLA-DR⁺. В гуморальном звене определялось снижение уровня IgM и IgG и повышение общего IgE при наличии контакта.

Схожие изменения наблюдались и при работе в условиях контакта с неорганическими соединениями азота. В процессе хронического контакта выявлен значительный процент лиц с повышением маркеров активации HLA-DR⁺, акт. Т-лимфоцитов, фагоцитоза и NK-клеток, что отражает совокупный активный уровень реагирования иммунной системы на факторы ПВ и позволяет расценивать изменения в ИС как синдром напряженности иммунной системы. Постоянно быть работоспособным может персонал, достаточно резистентный к воздействию этих факторов. Дисбаланс в каком-либо звене ИС может быть компенсирован за счет других его компонентов. Наличие изменений и установление характера иммунного дисбаланса, иммунной дисфункции определяет потребность в применении средств иммунокоррекции и проведении у персонала профилактических и оздоровительных мероприятий.

К особенностям изменений в ИС персонала при наличии контакта с гидразином и его производными можно отнести преобладание регуляторной ИН в системе Т-клеточного звена над количественными изменениями. Кроме того, – повышение более чем у 1/5 персонала CD8⁺-Т-лимфоцитов, а также CD16⁺-лимфоцитов у 37,84% (что

характерно для воздействия ХФ) и наиболее высокий уровень ФАН со *St. aureus* Wood. Различия в ИС при наличии и отсутствии контакта отличались снижением абсолютных значений CD4⁺-Т-лимфоцитов, уровня IgG, усилением экспрессии HLA-DR⁺ и акт. Т-лимфоцитов, а также снижением ФЧМ при опсонизации IgG при наличии контакта.

В условиях контакта с *алифатическими углеводородами* (УВ) выявлено достоверное повышение лейкоцитов, цитотоксических CD8⁺- и CD16⁺-лимфоцитов, наличие регуляторной недостаточности Т-клеточного звена, дисбаланс сывороточных Ig (↓ IgM ↑ IgA) и изменения в системе фагоцитоза. Различия в ИС при наличии и отсутствии контакта выражались в повышении лейкоцитов, абсолютных значений лимфоцитов, CD3⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-лимфоцитов и снижении CD4⁺-Т-лимфоцитов (%), индекса иммунорегуляции, уровня IgM, а также ФЧН, ФАМ спонтанной, ФАМ и ФЧМ при опсонизации IgG при наличии контакта.

Контакт с *алифатическими и ароматическими УВ* приводил к разным изменениям. Различия в ИС при наличии и отсутствии контакта определялись по значениям CD8⁺-Т-лимфоцитов (↑), ФЧН (↓) и ФЧМ при опсонизации IgG (↑). Больше различий выявлено по маркерам HLA-DR⁺ и активированных Т-лимфоцитов, которые снижены при наличии производственного контакта. Значительные различия выявлены в фенотипе ИС персонала при контакте с алифатическими и ароматическими УВ.

ИС персонала в условиях контакта с взрывчатыми материалами отличался достоверным повышением лейкоцитов, абс. значений CD8⁺-Т-лимфоцитов, уровня IgG, IgA и снижением акт. Т-лимфоцитов. Дисбаланс в системе фагоцитоза отличался повышением спонтанной и снижением адоптивной ФАН, повышением ФЧН, ФЧМ и ФЧМ при опс. IgG. Различия в ИС при наличии и отсутствии контакта выражались в повышении лейкоцитов, абс. значений лимфоцитов, CD3⁺-, CD4⁺-Т-лимфоцитов, процентного и абс. содержания CD8⁺-Т-лимфоцитов и снижении иммунорегуляторного индекса, акт. Т-лимфоцитов, в наличии дисбаланса Ig с повышением уровня IgG, IgA, в снижении адоптивной ФАН и повышении ФЧМ при опс. IgG при наличии контакта.

Анализ изменений ИС при наличии и отсутствии контакта в зависимости от ХФ выявил как особенности для каждого агента, так и общие изменения, встречающиеся при воздействии многих ХФ. Наиболее значимые различия определялись в условиях контакта с алифатическими УВ, взрывчатыми и абразивными веществами. Выявлены различия по отношению к населению, проживающему в зоне размещения и возможного влияния факторов риска его деятельности. Показано, что длительный контакт может приводить к развитию вторичной ИН, чаще – контакт с азотной кислотой, к регуляторной – контакт с взрывчатыми материалами, гидразином и его производными и алифатическими УВ. Агрессивными по воздействию на цитотоксическое звено являются практически все проанализированные химические вещества, что проявлялось в повышении CD16⁺-, CD8⁺-Т-лимфоцитов и указывало на его активацию. Сопоставление алгоритма отклонений в ИС у персонала с отсутствием контакта с ХФ по отношению к населению выявило схожий характер реагирования иммунной системы в условиях возможного косвенного влияния ХФ. Это обусловлено тем, что человек подвергается влиянию не одного, а комплексу факторов ПВ, которые взаимодействуют между собой и вносят вклад в изменения ИС, когда «переплетается» влияние всех факторов друг с другом [2]. В этом проявляется их синергизм, и исключение из влияния только одного ХФ не может отменить влияние других факторов с разными токсическими свойствами даже в условиях косвенного воздействия. Представлен алгоритм изменения ИС в зависимости от воздействующего ХФ.

Список литературы

1. Бандман А.Л. и др.: «Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения». Под ред. Филова В.А.//СПб: Химия, 1994, С. 688.
2. Куценко С.А.: «Основы токсикологии». С.П., 2002, с. 36-48.
3. Шуватова Е.В. Клинико-иммунологическая характеристика персонала Горно-химического комбината Красноярского края и населения, проживающего вблизи производства. // Дисс. канд. мед. наук, – М.2004. – С. 6; 11-28, 31-33, 38-50.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА БЕЛКОВ рчАФП И рчГКСФ НА СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОЖИ

*Е.А. Пряхин¹, Г.А. Тряпицына^{1,2}, М.В. Тюхай^{1,2}, И.А. Шапошникова¹,
Ю.И. Остроумов³, А.В. Аклеев^{1,2}*

¹ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА
России, г. Челябинск, Россия, e-mail: pryakhin@yandex.ru

²ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

³ОАО «Институт Инженерной Иммунологии», пос. Любучаны,
Чеховский р-н, Московская обл., Россия

Резюме: Гистологические исследования в модели лучевого ожога кожи III степени у мышей стока CD1 показали, что трансдермальное нанесение липосом на основе фосфолипидов, содержащих рекомбинантные человеческие белки рчАФП и рчГКСФ, на ожоговую рану в течение 2 недель после радиационного воздействия оказывает лечебное действие на стволовые клетки волосяных фолликулов: на 7-е, 21-е и 35-е сутки после облучения регистрируется более высокий уровень выживаемости стволовых клеток в волосяных фолликулах, более высокое содержание эпителиальных клеток в фолликулах, большее количество волосяных фолликулов в поле зрения по отношению к облучённому контролю.

Ключевые слова: облучение, мыши, кожа, лучевой ожог, лечение, рчАФП, рчГКСФ, липосомы

INFLUENCE OF LIPOSOMAL rhAFP AND rhGCSF PROTEINS PREPARATION ON SCIN STEM CELLS

*E.A. Pryakhin¹, G.A. Tryapitsyna^{1,2}, M.V. Tyukhay^{1,2}, I.A. Shaposhnikova¹, Yu.I. Ostroumov³,
A.V. Akleev^{1,2}*

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia,
e-mail: pryakhin@yandex.ru

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

³Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow region, Russia

Summary: It was shown in histological studies of CD1 mice model of the third-degree skin burn that transdermal phospholipid-based liposomes containing recombinant human proteins rhAFP and rhGCSF on the burn wound within 2 weeks after radiation exposure had a curative effect on the stem cells of the hair follicles. A higher survival rate of stem cells in the hair follicles, a higher content of epithelial cells in the follicles, a greater number of hair follicles in the microscope field as compared to the irradiated control were registered on the 7th, 21st, and 35th days after irradiation.

Key words: irradiation, mice, skin, radiation burn, treatment, rhAFP, rhGCSF, liposomes

В механизмах развития ранних лучевых поражений кожи большое значение имеет радиационно индуцированная гибель стволовых клеток и блокирование их деления. Наиболее чувствительным к радиационному воздействию клеточным компонентом кожи являются стволовые клетки эпидермиса, которые расположены, преимущественно, в основании волосяных фолликулов [1].

Целью данной работы являлось тестирование защитного действия липосомального препарата, содержащего белки рчАФП и рчГКСФ, на стволовые клетки эпидермиса мышей при локальном облучении кожи в дозе 60 Гр.

В эксперименте были использованы самцы мышей стока CD1 в возрасте 3-4 месяцев, массой 24-26 г. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали общим правилам работ с использованием экспериментальных животных [2].

Местное радиационное поражение кожи у мышей выполнено в соответствии с ранее разработанной авторами методикой [3] с использованием гамма-установки Государственного лечебно-профилактического учреждения «Челябинский областной клинический онкологический диспансер». Для получения ожога IIIA степени выполнено облучение эпилированного участка кожи спины площадью $1,5 \text{ см}^2$ в дозе 60 Гр (мощность дозы 5,5 Гр/мин). В эксперименте тестировали препарат, представляющий собой суспензию липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов (Lipoid S80, Германия), 1 мг/мл рЧАФП и 0,02 мг/мл рЧГКСФ.

Было сформировано 4 группы мышей численностью по 15 животных в каждой: 1 группа – биологический контроль; 2 группа – облучённый контроль; 3 группа – локальное гамма-облучение кожи + липосомы, содержащие рЧАФП и рЧГКСФ.

Препарат на место радиационного воздействия наносили однократно через 5 минут после облучения, затем ежедневно в течение 5 суток и далее на 7, 9, 11, 13 сутки после облучения: суммарная доза рЧАФП составила 2 мг; рЧГКСФ – 0,04 мг; фосфолипидов – 100 мг. Животным в группе облучённого контроля по той же схеме наносили физраствор. Трансдермальное нанесение 180-200 мкл липосомального препарата и физраствора на кожу мышей проводили с использованием дозатора-распрыскивателя.

Гистологические исследования кожи проводили на 7 (деструктивная фаза местных лучевых поражений кожи), 21 (репаративная фаза местных лучевых поражений кожи) и 35 (период эпителизации) сутки после облучения животных с использованием рутинных методов. Стволовые клетки эпидермиса определяли с помощью иммуно-гистохимической реакции с применением сыворотки CD34 (производство Dako, разведение 1/65) [4]. Оценивали количество фолликулов в 10 полях зрения, в каждом фолликуле определяли количество CD34⁺ и CD34⁻ клеток. Подсчёт исследуемых показателей проводился в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$. Площадь поля зрения измерялась автоматически при помощи программно-аппаратного комплекса для анализа и обработки изображений в микроскопии и составляла $1,2 \text{ мм}^2$.

Статистическую значимость отличий показателей в экспериментальных группах определяли с использованием t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Анализ гистологических препаратов показал, что локальное облучение кожи в дозе 60 Гр приводило к статистически значимому снижению по отношению к биологическому контролю количества волосяных фолликулов, количества эпителиальных клеток в фолликулах и количества стволовых клеток в фолликулах как у животных в группе облучённого контроля, так и у животных в группе облучённых животных, получавших лечение путём трансдермальной аппликации липосом, содержащих белки рЧАФП и рЧГКСФ (таблица).

Однако во все сроки обследования в экспериментальной группе, где после облучения животные получали лечение липосомами с рЧАФП и рЧГКСФ, количество фолликулов в месте лучевого ожога было в 3-9 раз выше, количество эпителиальных клеток в 5-28 раз выше, количество стволовых клеток в 4-60 раз выше по сравнению с облучённым контролем (отличия являются статистически значимыми). Следует особенно отметить, что в экспериментальной группе «Гамма-облучение + липосомы с рЧАФП и рЧГКСФ» количество стволовых клеток в поле зрения не снижалось в период с 7 по 35 сутки после облучения, в то время как в группе облучённого контроля численность стволовых клеток на 35 сутки по сравнению с 7 сутками после облучения снизилась в 10 раз.

Таким образом, результаты исследования позволяют заключить, что липосомальный препарат, содержащий белки рчАФП и рчГКСФ, оказывает лечебное действие на стволовые клетки кожи при радиационном ожоге, а с учётом собственных и литературных данных можно полагать, что данный препарат стимулирует пролиферацию стволовых клеток кожи.

Таблица – Гистологическая характеристика зоны лучевого ожога кожи IIIA степени у мышей в различные сроки после воздействия, $M \pm m$ в поле зрения ($1,2 \text{ мм}^2$)

Экспериментальные группы	Время после облучения, сут		
	7	21	35
Среднее количество волосяных фолликулов в поле зрения			
Биологический контроль	$12,6 \pm 0,46$	$7,14 \pm 0,76$	$12,17 \pm 0,65$
Облучённый контроль	* $0,71 \pm 0,15$	* $0,2 \pm 0,06$	* $0,1 \pm 0,05$
Гамма-облучение + липосомы с рчАФП и рчГКСФ	* † $2,63 \pm 0,4$	* † $1,8 \pm 0,43$	* † $0,73 \pm 0,2$
Среднее количество эпителиальных клеток в волосяных фолликулах в поле зрения			
Биологический контроль	516 ± 67	416 ± 112	370 ± 73
Облучённый контроль	* 6 ± 2	* 2 ± 1	* 1 ± 1
Гамма-облучение + липосомы с рчАФП и рчГКСФ	* † 34 ± 8	* † 21 ± 8	* † 28 ± 9
Среднее количество стволовых эпителиальных клеток (CD34 ⁺) в волосяных фолликулах в поле зрения			
Биологический контроль	235 ± 31	165 ± 44	110 ± 22
Облучённый контроль	* $3,5 \pm 1,0$	* $0,65 \pm 0,43$	* $0,3 \pm 0,3$
Гамма-облучение + липосомы с рчАФП и рчГКСФ	* † 13 ± 3	* † 12 ± 4	* † 18 ± 6
Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя в биологическом контроле; † – статистически значимые отличия от показателя в облучённом контроле; $p \leq 0,05$.			

Список литературы

1. Alonso L., Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium // PNAS. 2003. V. 100. Suppl. 1. P. 11830–11835.
2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными». Рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. 48 с.
3. Тряпицына Г.А., Атаманюк Н.И., Обвинцева Н.А. и др. Методика получения местного радиационного поражения кожи у мышей с использованием установки Кибер-Нож // Вопросы радиационной безопасности. 2016. №1. С. 47-52.
4. Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E., Dua H.S., Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors // Stem Cells. 2014. V. 32(6). P. 1380–1389.

ПОВЫШЕНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

*Г.А. Посыпанова, М.Г. Ратушняк, Ю.П. Семочкина, О.В. Высоцкая, А.И. Глухов,
А.В. Родина, Е.Ю. Москалева*

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия,

e-mail: ratushnyak_marya@mail.ru

Резюме. Повреждение мозга при лучевой и химиотерапии в значительной мере определяется нарушением нейрогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины в гиппокампе в результате повреждения нейральных стволовых клеток (НСК). В работе охарактеризована радиочувствительность НСК мыши, культивируемых *in vitro* в виде нейросфер и в виде прикрепляющихся клеток при действии γ -излучения. Обнаружено, что комплекс факторов, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из жировой ткани повышает выживаемость НСК после действия γ -излучения.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, нейротрофины, цитокины, γ -излучение.

Factors secreted by mesenchymal stem cells increase the survival of irradiated mouse neural stem cells

G.A. Posypanova, M.G. Ratushnyak, Yu. P. Semochkina, A.V. Rodina, O.V. Vysotskaya, A.I. Gluchov, E. Yu. Moskaleva

National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia,

e-mail: ratushnyak_marya@mail.ru

Summary. Brain injury induced by radiotherapy and chemotherapy is largely determined by disruption of neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus as a consequence of the neural stem cells (NSC) damage. In this study, we characterized the radiosensitivity of mouse NSC cultured *in vitro* as neurospheres or as attached cells. It was found that a complex of factors secreted by mesenchymal stem cells (MSC) from adipose tissue increases the survival of the NSC after γ -irradiation.

Key words: neural stem cells, conditioned medium, mesenchymal stem cells, neurotrophins, cytokines, γ -irradiation.

В отдаленный период после лучевой терапии опухолей головного мозга и головы и шеи развиваются нарушения когнитивных функций, которые связывают с повреждением нейральных стволовых клеток (НСК) зубчатой извилины гиппокампа. Поэтому актуальной задачей является поиск средств, способных снизить гибель НСК. В нескольких исследованиях показано, что введение МСК облученным животным приводит к повышению их выживаемости [1-4]. Использование кондиционированной среды МСК также способствовало повышению репарации радиационных повреждений [5]. У людей при использовании МСК для лечения острых лучевых поражений обнаружено улучшение процессов регенерации [5-7]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния факторов, секретируемых МСК, на выживаемость облученных НСК мыши.

НСК выделяли из головного мозга новорожденных мышат, культивировали и характеризовали по набору специфических антигенов. С помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии показано, что 86-92% НСК (6-9 пассаж) были нестин-положительными, кроме того в культурах НСК присутствовало небольшое количество клеток, содержащих маркеры дифференцировки астроцитов, нейронов, олигодендроцитов, и предшественников олигодендроцитов. Таким образом,

полученные препараты клеток соответствовали фенотипу НСК. Концентрацию цитокинов в кондиционированной среде (КС) МСК определяли иммуноферментным методом. В МСК из жировой ткани (МСК-ЖТ) обнаружен высокий уровень экспрессии генов и активности нейротрофинов NGF и BDNF и секреции цитокинов VEGF и HGF. НСК подвергали действию γ -излучения в дозах 0,5; 1, 2 и 4 Гр. Через 1 час после облучения к НСК добавляли КС МСК-ЖТ. Выживаемость НСК оценивали через 72 ч после облучения. Количество и размер образующихся в культуре нейросфер снижались пропорционально дозе облучения. Показано, что защитный эффект КС зависит от дозы облучения НСК, и от использованной концентрации КС. При небольших дозах 0,5 и 1 Гр обнаружено защитное действие КС при ее концентрации 10 и 25%. Наиболее эффективная защита обнаружена при концентрации КС, равной 25%. При дозе 2 Гр выживаемость облученных НСК в присутствии КС МСК, также превышала выживаемость облученных клеток на 10-13%. При облучении НСК в дозе 4 Гр КС МСК была не эффективна. Таким образом, при действии КС МСК повышение выживаемости НСК *in vitro* имеет место только при облучении в небольших дозах 0,5; 1 и 2 Гр, когда снижение выживаемости НСК после облучения не превышает 50%.

Список литературы

1. Nicolay N.H., Lopez Perez R., Saffrich R., Huber P.E. Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic // *Oncotarget*. – 2015. – Т. 6, № 23. – С. 19366-80.
2. Nicolay N.H., Lopez Perez R., Debus J., Huber P.E. Mesenchymal stem cells - A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? // *Cancer Lett.* – 2015. – Т. 366, № 2. – С. 133-40.
3. Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury // *Cell Death Dis.* – 2013. – Т. 4. – С. e685.
4. Wang R., Zhu C.Z., Qiao P., Liu J., Zhao Q., Wang K.J., Zhao T.B. Experimental treatment of radiation pneumonitis with human umbilical cord mesenchymal stem cells // *Asian Pac J Trop Med.* – 2014. – Т. 7, № 4. – С. 262-6.
5. Chapel A., Francois S., Douay L., Benderitter M., Voswinkel J. New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy // *World J Stem Cells.* – 2013. – Т. 5, № 4. – С. 106-11.
6. Chapel A., Francois S., Douay L., Benderitter M., Voswinkel J. Fifteen years of preclinical and clinical experiences about biotherapy treatment of lesions induced by accidental irradiation and radiotherapy // *World J Stem Cells.* – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 68-72.
7. Kursova L.V., Konoplyannikov A.G., Pasov V.V., Ivanova I.N., Poluektova M.V., Konoplyannikova O.A. Possibilities for the use of autologous mesenchymal stem cells in the therapy of radiation-induced lung injuries // *Bull Exp Biol Med.* – 2009. – Т. 147, № 4. – С. 542-6.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ МАЗИ
НА ОСНОВЕ ТАМЕРИТА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ
РАДИАЦИОННО-МЕХАНИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

Д.В. Ремизов, А.Ю. Кондаков, А.В. Степанов, Д.Б. Пономарев, П.В. Тихомиров
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины Министерства обороны Российской Федерации,
г. Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: r.laboratory@yandex.ru

Резюме. Исследовали влияние мази на основе тамерита на скорость регенеративных процессов у крыс при комбинированном радиационно-механическом поражении. Установлено, что при использовании в качестве местного лечения мази тамерит, сроки заживления механического компонента комбинированного поражения сокращались на 6,5 сут в сравнении с животными не получавшими лечение.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, комбинированное радиационно-механическое поражение, мазь тамерит, местное лечение, репаративная регенерация.

**EFFICIENCY OF TAMERITWOUND-HEALING OINTMENT IN
COMBINED RADIATION MECHANICAL INJURY
(EXPERIMENTAL STUDY)**

D.V. Remizov, A.Y. Kondakov, A.V. Stepanov, D.B. Ponomarev, P.V. Tikhomirov.

The State Research Test Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russian Federation,
e-mail: r.laboratory@yandex.ru

Abstract. The tamerit ointment effect on the rate of regenerative processes in rats with combined radiation mechanical injury was studied. It was determined that tamerit ointment using as a topical treatment reduced the healing time of combined injury mechanical component on 6.5 days compared to untreated animals.

Key words: ionizing radiation, combined radiation mechanical injury, tamerit ointment, topical treatment, reparative regeneration.

Проблема ранней терапии комбинированных радиационно-механических поражений (КРМП) как патологии, присущей техногенным авариям на радиационно опасных объектах, а также боевым действиям или террористическим актам с применением оружия массового поражения остается не решенной. Чрезвычайно актуальной остается проблема поиска средств, стимулирующих процессы посттравматической регенерации при КРМП. Это связано с тем, что влияние ионизирующей радиации на процессы репаративной регенерации обусловлены не только ее непосредственным влиянием на травмированные ткани, но и развивающимися нарушениями в системе гемостаза и иммунитета, вызывающими повышенную кровоточивость тканей, развитие раневой инфекции, в том числе и генерализованных форм. В этих условиях поиск фармакологических средств, позволяющих оптимизировать течение раневого процесса, сократить сроки

заживления ран, особенно до периода разгара костномозгового синдрома, приобретает немаловажное значение.

Цель исследования: изучение эффективности ранозаживляющего действия мази на основе тамерита, при местном применении у животных подвергнутых КРМП.

Тамерит – иммуномодулирующее и антиоксидантное средство, оказывающее противовоспалительное действие. Мазь содержит 0,7 г тамерита и 100 г эфтилина, производства ООО «ЛДФ «Медик» (Свердловская обл.). Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животных подвергали общему однократному γ -облучению в ЛД_{50/30}. Затем, через 15–30 мин крысам наносили полнослойную рану кожи спины (диаметром 5 – 6 см). Исследовали влияние мази на основе тамерита на скорость регенеративных процессов у животных, с КРМП. Наложение мази осуществляли ежедневно один раз в сутки в течение 7 дней. Динамику раневого процесса оценивали планиметрическим методом с регистрацией сроков полного заживления пораженного участка кожи. В качестве препарата сравнения использовали комбинированное противомикробное средство «Левомеколь».

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что заживление резанной раны кожи спины у облученных животных без лечения происходит в среднем на $41,3 \pm 5,32$ сут. Тогда как у крыс с КРМП, которым в качестве местного лечения наносили мазь на основе тамерита, сроки заживления механического компонента комбинированного поражения сокращались в среднем на 6,5 сут (по сравнению с облученным контролем) и составили $34,8 \pm 4,91$ сут. Применение в качестве средства лечения механического компонента КРМП мази «Левомеколь» ускоряло процессы заживления раны на 8,2 сут, полное заживление раны при этом происходило уже к $33,1 \pm 2,7$ сут.

В целом, результаты экспериментального исследования позволяют заключить, что ежедневное применение мази на основе тамерита в течение 7 сут способствует сокращению сроков заживления механического компонента КРМП на 18 %, в то же время, мазь «Левомеколь» способствует заживлению резанной раны у животных с КРМП быстрее на 20 % по сравнению с облученными животными, не получавшими лечение.

Таким образом, эффективность мази на основе тамерита вполне сопоставима с лечебным действием антимикробного комплексного средства «Левомеколь». Изменение терапевтической схемы применения мази на основе тамерита (по кратности и продолжительности сроков местного лечения) вероятно, позволит ускорить процессы репаративной регенерации механического компонента КРМП.

ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СРЕДСТВ

Л.М.Рождественский

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», Москва, Россия,
e-mail: lemrod@mail.ru

Резюме. Кризис разработок противолучевых средств (ПЛС) в России проявляется в отсутствии новых и слабом использовании в медицинской практике разработанных препаратов (беталейкин, индралин). Альтернативой скрининговому подходу и концепции перехвата свободных радикалов является выявление фармакологических эффектов веществ, ведущих к повышению радиорезистентности (ПР). Невозможность проведения для ПЛС 2-й стадии клинических испытаний на облученных пациентах может быть преодолена введением ПЛС здоровым добровольцам с оценкой у них маркеров ПР, разработанных на лабораторных животных (включая крупных). Практически необеспеченные медикаментозно сценарии возможного лучевого воздействия – низкоэнергетическое пролонгированное облучение в не летальных дозах (работа в очагах радиационных аварий) и воздействие космического излучения при пилотируемых полетах. В ФМБЦ им. А.И.Бурназяна проводится поиск ПЛС, снижающих отдаленные последствия облучения. На модели низкоэнергетического (10 мГр/мин) пролонгированного (21 ч) γ -облучения мышей отмечены на сроки 3-10 мес позитивные эффекты беталейкина и рибоксина по ряду показателей, кроме выхода опухолей.

Ключевые слова: противолучевые средства, маркеры повышенной радиорезистентности, 2-я стадия клинических испытаний противолучевых средств, отдаленные последствия облучения

RADIATION COUNTERMEASURE AGENTS ELABORATING PROBLEMS

L.M.Rozhdestvensky

State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, e-mail: lemrod@mail.ru

Summary. Absence of new radiation countermeasure agents (RCA) or low usage of elaborated RCA (betaleukine, indraline) in practice medicine are the signs of the RCA elaborating area crisis in Russia. Alternatives to screening search of new RCA and to free radicals scavengers should become pharmacological countermeasure agents increasing resistance to irradiation (RR). Impossibility of the clinical trial 2-nd stage for RCA on exposed patients may be overcome by means of RR markers usage on healthy volunteers-testers, after administering RCA. RR marker for each of RCA should be found in preliminary experiences on laboratory animals including large ones. Radiation incident scenarios that have not permitted RCA for protection are prolonged exposure with low dose rate (working in an area with moderately high irradiation level) and cosmic irradiation exposure on spacemen. There is in Burnasyan FMBC search of RCA capable to decrease remote radiation effects. Positive influence of betaleukine and riboxin had been detected in 3-10 months after exposure concerning some remote effects excluding tumorigenic effect.

Key words: radiation countermeasure agents, markers of resistance to irradiation increasing, clinical 2-nd stage trial of radiation countermeasure agents, remote radiation effects.

Кризис области радиобиологии, занимающейся разработкой противолучевых средств (ПЛС), проявляется в России в уменьшении вовлеченных в эти исследования центров и снижении уровня оснащенности их исследовательской инфраструктуры, в отсутствии новых и слабом использовании в медицинской практике (прежде всего, в лучевой терапии опухолей) разработанных препаратов (беталейкин, индралин). Кризис связан с исчерпанием возможностей скринингового подхода к поиску ПЛС, с ограниченной адекватностью химических моделей лучевого поражения (акцент на перехват свободных радикалов и активных форм кислорода/азота), с отсутствием налаженных технологических цепочек разработки ПЛС (технолог-радиобиолог-медик) для радиационных инцидентов и применения ПЛС двойного назначения в медицинской практике, с неадекватностью нормативных документов доклинического исследования и клинического испытания ПЛС.

Альтернативой скрининговому подходу и концепции перехвата свободных радикалов является выявление фармакологических эффектов веществ, ведущих к повышению радиорезистентности (ПР) путем ослабления поражения и/или ускорения восстановления. Этим требованиям отвечает предложенная автором бинарная классификация ПЛС, построенная на принципах выявления рецептора, сигнальной цепочки и маркера противолучевого эффекта для каждого ПЛС или ограниченной группы сходных веществ [1].

Главным препятствием к доведению ПЛС до уровня медицинского препарата является требование проведения 2-й стадии клинических испытаний на пациентах с лучевым поражением, что практически невыполнимо. Выходом может стать индикационный подход с использованием в процессе клинических испытаний отработанных на лабораторных животных маркеров ПР, т.е. без облучения. При этом решается также проблема использования крупных лабораторных животных – не как объектов облучения, а как модели оценки маркеров ПР при введении ПЛС. Согласно бинарной классификации ПЛС подразделяются на две группы: а) оксидомодуляторы (исторически – радиопротекторы), с маркерами ПР в виде ΔpO_2 , ΔOVP , ΔNO ; б) цитомодуляторы (исторически – стимуляторы резистентности/репарации, митигаторы) с маркерами в виде активации транскрипционного фактора NF- κB , ΔG -КСФ, ДИЛ-6.

Номинально медикаментозно прикрытыми сценариями радиационного поражения, опасного для жизни, могут считаться: острое облучение любого генеза (индралин и беталейкин профилактически в случае ожидаемого воздействия и беталейкин, тромбopoэтин как средства экстренной терапии при внезапных воздействиях). Однако ряд конкретных деталей применения указанных ПЛС (дозы, ингибиторы) нуждается в отработке при клинических испытаниях на добровольцах.

Остается проблемой использование ПЛС в практике лучевой терапии онкологических заболеваний. Фактически используемыми средствами являются беталейкин и амифостин, потенциальным – флагеллин, ингибитор NOs T1023. Сценариями возможного лучевого воздействия, особо нуждающимися в разработке эффективных ПЛС, остаются низкоэнергетическое пролонгированное облучение в не летальных дозах (работа в очагах радиационных аварий) и воздействие космического излучения при пилотируемых полетах.

В ФМБЦ им. А.И.Бурназяна проводится поиск ПЛС, способных снизить отдаленные последствия облучения [2-4]. Разработана модель низкоэнергетического (10 мГр/мин) пролонгированного (21 ч) γ -облучения мышей, позволившая зафиксировать

через 3-10 мес после облучения в дозе 12,6 Гр последствия в виде спленомегалии, анемии, нестабильности генома (фокусы γ H2AX и кометы), изменений экспрессии P53, микроРНК-145,-125, выхода опухолей.

Обнаружение на данной модели облучения злокачественных новообразований через 10 мес после облучения позволяет принять ее как подходящую для поиска средств профилактики отдаленных последствий облучения. Обнаружение эффектов на уровне клеточно-тканевых и молекулярно-генетических структур в отдаленные сроки после облучения (3-10 мес) позволяет рассматривать их в качестве маркеров нестабильности не только генома, но и физиологических процессов поддержания гомеостаза.

Наиболее важен, по-видимому, отмеченный факт усиления экспрессии гена p53, охраняющего стабильность генома, как в контроле (по отношению к биоконтролю), так и в защищенных беталейкином и рибоксином группах (по отношению к контролю). Однако, с учетом отдаленности отмеченного феномена от срока облучения его трактовка пока недостаточно ясна.

Перспективными маркерами отдаленных эффектов облучения (возможно, даже канцерогенного эффекта) представляются фокусы гистона γ H2AX.

Отмечены локальные позитивные эффекты беталейкина и рибоксина на разные сроки по ряду показателей (дифференциальная лейкограмма, анемия, фокусы γ H2AX и кометы), кроме частоты спленомегалий и выхода опухолей.

Список литературы

1. Л.М.Рожественский. Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения. «Радиационная биология. Радиоэкология», 2017, т. 57, № 2, с. 117-135.

2. Л.М.Рожественский, В.Ф.Михайлов, А.Н.Осипов. Современное состояние разработок противолучевых средств. «Актуальные направления развития медицинских средств защиты от экстремальных факторов». Сборник материалов Научно-практической конференции, посвященной 25-летию ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России 22 ноября 2017 г, Москва. Москва 2017, с. 96-99.

3. Л.М.Рожественский, Т.Г.Шлякова, К.Ю.Трубицина, Н.И.Лисина, Р.А.Щеголева, В.В.Зорин, Н.Ю.Воробьева, А.Э.Шкаев, А.Б.Шехтер, А.Н.Осипов. Профилактическое применение противолучевых средств у мышей при низкоинтенсивном γ -облучении.

«Радиационная биология. Радиоэкология», 2017, т. 57, № 6, с. 608-620.

4. Н.Ю.Воробьева, А.К.Грехова, К.Ю.Трубицина, А.В.Пчелка, Л.М.Рожественский, А.Н.Осипов. Интерлейкин-1 β способен снижать проявления отдаленных последствий пролонгированного воздействия низкоинтенсивного гамма-излучения. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2015, Т. 160, № 10, с. 474-477.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ РАДИАЦИОННО-МЕХАНИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ

И.М. Самохвалов¹, А.Б. Селезнёв², А.М. Носов¹

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ,
Санкт-Петербург, Россия.

² Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.

e-mail: artem_svu06@mail.ru

Резюме. В работе описаны и обоснованы наиболее актуальные и перспективные методы хирургического лечения комбинированных радиационных поражений. К таким методам относятся рентгенэндоваскулярные вмешательства, методы малоинвазивного остеосинтеза, методика неоперативного лечения повреждения органов живота, а также применение местных гемостатических средств. В литературе отсутствуют какие-либо данные указывающие на эффективность современных методов хирургического лечения комбинированных радиационных поражений.

Ключевые слова: комбинированные радиационные поражения, рентгенэндоваскулярное лечение, неоперативное лечение при травме.

PERSPECTIVE METHODS OF SURGICAL TREATMENT COMBINED RADIATION-MECHANICAL INJURIES

I.M. Samokhvalov¹, A.B. Seleznev², A.M. Nosov¹

¹ Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia.

² State Research Institute of Military Medicine, RF Ministry of Defense, St.

Petersburg, Russia. e-mail: artem_svu06@mail.ru

Abstract. The most current and promising methods of surgical treatment of combined radiation injuries are described and justified in this work. Such methods include interventional radiology, methods of minimally invasive osteosynthesis, a technique for nonoperative management of abdominal injuries, and the use of local haemostatic agents. In the literature, there are no data indicating the effectiveness of modern methods of surgical treatment of combined radiation injuries.

Key words: combined radiation injuries, interventional radiology, non-operative management in trauma.

Актуальность проблемы:

Как показал анализ последствий бомбардировок японских городов, в случае применения ядерного оружия происходит формирование массовых санитарных потерь. При этом 15-20% пораженных будут иметь изолированные лучевые поражения, а остальные – комбинированные радиационные поражения (КРП). Появление нового вида патологии – КРП - обусловило проведение исследований особенностей его клинической картины, патогенеза и лечения. В результате этого во второй половине XX века были подробно изучены течение раневого процесса, особенности заживления ран мягких тканей, органов брюшной полости или консолидации костных отломков в условиях КРП с механическим, огнестрельным или термическим компонентом. Однако в 1990-х годах интерес к изучению новых хирургических методов лечения комбинированных радиационно-механических поражений (КРМП) заметно снизился, а развитие хирургии, в том числе хирургии повреждений не останавливалось.

Материалы и методы. Выполнен анализ доступной литературы, посвященной современным методам хирургического лечения комбинированных радиационных поражений.

На сегодняшний день в военно-полевой хирургии и хирургии повреждений активно используются следующие методы лечения: эндовидеохирургические вмешательства, рентгенэндоваскулярная хирургия (для остановки продолжающегося внутреннего или наружного кровотечения и восстановления проходимости поврежденных магистральных сосудов), методы неоперативного лечения повреждений паренхиматозных органов, различные методики остеосинтеза при переломах костей (интрамедуллярный остеосинтез, наkostный остеосинтез пластинами, остеосинтез мини винтами переломов костей таза). Все перечисленные методы лечения широко используются в травмоцентрах различного уровня в России и за рубежом [1; 2; 3; 4; 5].

Перспективность указанных методик в случае с КРП заключается в том, что все они малоинвазивны или же оперативное вмешательство не выполняется вовсе, что безусловно позволит снизить выраженность характерного для КРП феномена взаимного отягощения и как результат повысить выживаемость пораженных.

При этом исследована лишь эффективность применения эндовидеохирургии при КРМП, а эффективность остальных перечисленных методов лечения не исследована.

Помимо новых методов хирургического лечения появились различные высокоэффективные местные гемостатические средства отечественного и зарубежного производства, которые позволяют избежать наложения жгута даже в случае повреждения магистральных сосудов [6]. В случае применения местных гемостатических средств сохраняется коллатеральный кровоток, в то время как при применении жгута кровоснабжение конечности полностью прекращается, что может негативно сказаться на результате лечения пораженных.

Выводы.

1. Предполагается, что внедрение новых современных малоинвазивных хирургических технологий при оказании помощи раненым с КРМП позволит качественно улучшить результаты лечения, благодаря снижению отягощающего влияния нелучевых поражающих факторов на патологический процесс в целом.

2. Актуальным является проведение серии экспериментальных исследований с целью изучения возможности применения современных хирургических технологий при лечении комбинированных радиационно-механических поражениях.

Список литературы:

1. Самохвалов И.М., Петров А.Н., Ерофеев А.А. [и др.] Имплантация стент-графта по поводу разрыва грудной аорты при политравме // Вестник хирургии ИМ. И.И. Грекова. - 2013. – Т.172, № 5. – с.101-107.
2. Ierardi A.M., Duka E, Lucchina N. [et al.] The role of interventional radiology in abdominopelvic trauma // Br J Radiol. – 2016. - Vol. 89 N. 1066, p. 20150866
3. Christmas A.B., Wilson A.K., Manning B. [et al.] Selective management of blunt hepatic injuries including nonoperative management is a safe and effective strategy // Surgery. – 2005. – Vol. 138, N 4. – p. 604-610.
4. Тимербулатов М.В., Сахаутдинов В.Г. Неоперативное лечение пострадавших с повреждениями селезенки при закрытой травме живота // Медицинский вестник башкортостана . – 2007. – Т.2, №6. – с. 88-94
5. Ганин В.Н., Борисов М.Б., Розбицкий В.В. [и др.] // Здоровье. медицинская экология. наука. – 2012. Т. 47-48 № 1,2. – с. 75-76
6. Самохвалов И.М., Рева В.А., Пронченко А.А. [и др.] Местные гемостатические средства: новая эра в оказании догоспитальной помощи // Политравма – 2013.- №1, с. 80-86

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ T1023 К СЕЛЕКТИВНОЙ ЗАЩИТЕ НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Самсонова А.С., Филимонова М.В., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И., Филимонов А.С., Макаrchук В.М., Чеснакова Е.А., Суринова В.И.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: alinasamsonova.515@gmail.com

Резюме. Проведённые исследования показали, что как при однократном, так и при гипофракционированном воздействии γ -излучения соединение T1023, введённое за 30 мин до радиационного воздействия в дозе 75 мг/кг (1/4 ЛД₁₆) мышам с солидной КЭ, выражено ограничивало альтерацию нормальных тканей и клинико-морфологическую степень лучевой реакции кожи. Соединение T1023 не модифицировало эффекты γ -излучения в отношении опухоли и не снижало терапевтическую эффективность радиотерапии. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов синтаз оксида азота для фармакологической профилактики осложнений лучевой терапии.

Ключевые слова: лучевые повреждения, селективная защита нормальных тканей, ингибиторы синтаз оксида азота

THE ESTIMATION OF T1023 ABILITY TO SELECTIVELY PROTECT THE NORMAL TISSUES IN THE ERLICH CARCINOMA EXPERIMENTAL MODEL

Samsonova A.S., Filimonova M.V., Korneeva T.S., Shevchenko L.I., Filimov A.S., Makarchuk V.M., Chesnakova E.A., Surinova V.I.

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation
e-mail: alinasamsonova.515@gmail.com

Summary. The studies showed the ability of T1023 compound administered 30 min before radiation exposure at a dose of 75 mg / kg (1/4 LD₁₆) to mice with solid EC, to severely restrict the alteration of normal tissues and the clinical and morphological degree of radiation reaction of the skin after both single and hypofractionated γ -radiation. Compound T1023 did not modify the influence of γ -radiation on the tumor and didn't reduce the therapeutic efficacy of radiotherapy. The obtained results indicate the prospects of using inhibitors of nitric oxide synthase for pharmacological prophylaxis of complications of radiation therapy.

Key words: radiation injuries, selective protection of normal tissues, inhibitors of nitric oxide synthase

В настоящее время в России на учёте с различными онкологическими заболеваниями состоит около 3 млн. больных [2]. Широкое внедрение в онкологическую практику различных схем и методов лучевой терапии не только повышает эффективность лечения злокачественных новообразований, но и несёт в себе определённые риски возникновения у больных лучевых повреждений [1]. Как ранние, так и, в особенности, поздние лучевые повреждения приводят к инвалидизации и потере социальной активности онкологических больных. Лечение и профилактика таких осложнений лучевой терапии представляет собой крайне сложную проблему, поскольку фармакологические средства, используемые в онкологических клиниках,

недостаточно эффективны и применяются в основном для лечения уже возникших осложнений. Решением данной проблемы могут стать новые подходы к профилактике лучевых повреждений с помощью средств, селективно защищающих нормальные ткани. В лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба показано, что в качестве таких веществ могут быть использованы соединения, селективно ингибирующие эндотелиальную синтазу оксида азота (NOS) и повышающие радиорезистентность биологических тканей путём индукции транзиторной циркуляторной гипоксии [3,4].

Цель исследования: изучение на моделях лучевой терапии экспериментальных опухолей способности соединения T1023 к селективной противолучевой защите нормальных тканей.

Материалы и методы. Исследование проведено на самках белых аутбредных мышей в возрасте 2-2,5 месяцев массой 23-25 г. В качестве опухолевой модели в работе была использована карцинома Эрлиха (КЭ) в солидной форме. В первом эксперименте на 7 сутки после перевивки опухоли, когда опухолевый узел хорошо определялся у всех особей, животные получали локальное γ -излучение в дозе 30 Гр. Во втором эксперименте животные опытных групп дважды, на 7-е и 9-е сутки роста КЭ получали локальное радиационное воздействие в дозе 20 Гр. В обоих экспериментах мышам вторых опытных групп за 30 мин до каждого облучения в/б вводили ингибитор NOS – T1023 в дозе 75 мг/кг (1/4 ЛД₁₆). Клинико-морфологическую картину острых лучевых повреждений кожи на облученной конечности оценивали по классификации Радиотерапевтической онкологической группы и Европейской организации по исследованию и лечению рака RTOG/EORTC, 1995.

Результаты и обсуждение. Результаты первого эксперимента показали, что после локального радиационного воздействия в дозе 30 Гр на облученной конечности мышей первой опытной группы быстро развивался выраженный лучевой ожог (около 15% животных имело сливной эпидермит, который осложнялся кровотечениями и развитием глубоких дефектов). Соединение T1023, введенное однократно в дозе 75 мг/кг перед лучевым воздействием, выражено ослабляло степень лучевой альтерации кожи облученной конечности подопытных животных. При этом воздействие γ -излучения в дозе 30 Гр оказывало выраженное, равное по эффективности противоопухолевое действие, и на всех этапах наблюдения развитие КЭ у мышей опытных групп статистически не различалось. Во втором эксперименте после локального воздействия гипофракционированного γ -излучения (20+20 Гр) на облученной конечности мышей первой опытной группы развивался менее тяжелый лучевой ожог, в сравнении с первым экспериментом при однократном воздействии в дозе 30 Гр. Как и в первом эксперименте, применение исследуемого соединения T1023 перед каждой фракцией лучевого воздействия также отчетливо ослабляло степень лучевой альтерации в тканях облученной конечности (15-20% животных не имело каких-либо проявлений лучевого ожога в течение всего срока наблюдения). Также, как и в первом эксперименте, влияния T1023 на радиочувствительность опухолей и модификации лучевых эффектов в отношении КЭ практически не наблюдалось. Следует отметить, что, если повреждение нормальных тканей при гипофракционированном облучении ощутимо ослабевало, то противоопухолевый эффект γ -излучения несколько возрастал.

Выводы. В проведенных исследованиях на разработанной экспериментальной модели лучевой терапии солидной формы КЭ у мышей продемонстрирована способность T1023 в значительной мере селективно защищать нормальные ткани как при однократном, так и при гипофракционированном воздействии γ -излучения без снижения терапевтической, противоопухолевой эффективности. Полученные

результаты свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов NOS для фармакологической профилактики осложнений радиотерапии.

Список литературы

1. Ильин Л.А. (ред.) Радиационная медицина. Том 2. Радиационные поражения человека. М.: Изд. АТ, ГНЦ Институт биофизики, 2001. 432 с.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова В.Г. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
3. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Трофимова Т.П. и др. К вопросу о механизме радиозащитного действия ингибиторов NO-синтаз // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 5. С. 500–506.
4. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макаручук В.М. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55, № 3. С. 250-259.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАДИОПРОТЕКТОРА (2-(НАФТАЛЕН-1-ИЛ,МЕТИЛ)-4,5-ДИГИДРО-1Н-ИМИДАЗОЛ) НА МОДЕЛИ КОМБИНИРОВАННОГО РАДИАЦИОННО-МЕХАНИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ

А.М. Свентицкая¹, Е.Д. Шедько¹

¹ ООО «ИФК «Сильвер Фарм»», Санкт-Петербург, Россия
e-mail: sventiciy2008@yandex.ru

Резюме. В эксперименте на крысах изучено влияние профилактического введения радиопротектора (РП) при комбинированном радиационно-механическом поражении (КРМП) на выживаемость, среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и количественные характеристики основных компонентов периферической крови. Представлены данные о дозозависимом характере развития и протекания заболевания. Установлено, что на фоне применения РП при облучении животных в дозе 6,5 Гр и последующем нанесении компрессионной травмы происходит увеличение СПЖ крыс относительно изолированного КРМП, а также достоверное повышение числа лейкоцитов на 7-е сут эксперимента.

Ключевые слова: комбинированное радиационно-механическое поражение, синдром длительного сдавливания, радиопротектор, облучение, выживаемость, средняя продолжительность жизни, лейкоциты, тромбоциты.

STUDY OF THE EFFICACY OF THE RADIOPROTECTOR (2-(NAFTALEN-1-YL, METHYL)-4,5-DIHYDRO-1H-IMIDAZOL) ON THE MODEL OF COMBINED RADIATION-MECHANICAL INJURY

A.M. Sventickaya¹, E.D. Shedko¹

¹ LLC «Innovative Pharmaceutical Company «Silver Pharm», St. Petersburg,
e-mail: sventiciy2008@yandex.ru

Summary. The influence of radioprotector prophylactic administration combined with radiation-mechanical injury on survival, life expectancy and basic hematological parameters was evaluated in the experiment on rats. In the results obtained dose-dependent disease development was indicated. It is of interest that injection of radioprotector before radiation exposure in dose 6,5 Gy and subsequent compression injury caused an increase in life expectancy compared with isolated combined radiation-mechanical injury and a leukocyte count significantly increased on day 7th after the exposure.

Key words: combined radiation-mechanical injury, long-term compression syndrome, radioprotector, irradiation, survival, life expectancy, leukocytes, platelets.

Среди комбинированных радиационных поражений (КРП) наиболее высока вероятность возникновения КРМП при одновременном или последовательном воздействии на организм ионизирующего излучения и механического этиологического фактора (сейсмозрывные волны и механические повреждения, обусловленные разрушениями поврежденных ударной волной объектов) [3]. В частности, при продолжительном воздействии на конечности и другие анатомические области травмирующих факторов (массивные фрагменты инженерных сооружений, разрушающихся зданий, транспортных средств) формируется синдром длительного сдавливания (СДС). Следует отметить, что в доступных литературных источниках практически отсутствуют экспериментальные данные об эффективной терапии компрессионной травмы на фоне острого радиационного поражения. В то же время

существует предположение, что комплекс лечебно-профилактических мероприятий, выполненный до начала периода разгара острой лучевой болезни, будет обладать эффективностью, сопоставимой со своевременным лечением изолированного СДС [3]. При исследовании эффективности препаратов, потенциально перспективных для использования в составе лечебно-профилактических комплексов в качестве средств ранней патогенетической терапии, необходимо учитывать возможность их физико-химической и биологической несовместимости с радиопротектором. Таким образом, представляет интерес изучение эффективности профилактического применения РП при комбинированных радиационных поражениях для уточнения его радиозащитных механизмов на фоне компрессионной травмы.

Цель исследования: изучение влияния профилактического применения радиопротектора при КРМП (облучение крыс в диапазоне доз 4-7 Гр с последующим сдавливанием задней конечности) на выживаемость, СПЖ и основные показатели периферической крови.

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г в соответствии с принципами биоэтики и с учетом требований нормативно-правовых документов о порядке проведения исследовательских работ с применением животных [1, 2]. Радиопротектор в дозе 5 мг/кг вводили внутривентриально за 10-15 мин до облучения. Радиационный компонент КРМП моделировали путем общего однократного γ -облучения крыс в диапазоне доз 4-7 Гр на установке ИГУР-1 (мощность дозы 1 Гр/мин), механический компонент – путем наложения на мягкие ткани задних конечностей зажимов с металлическими пластинками через 10-15 мин после облучения с продолжительностью компрессии 8,0-12,0 ч. Срок наблюдения за животными составил 28 сут. Особенности течения и исходы поражения оценивали по выживаемости и СПЖ экспериментальных особей. Методом пробит-анализа по Финни были рассчитаны пороговые (LD_{16}), среднелетальные (LD_{50}) и летальные (LD_{99}) дозы в экспериментальных группах. Проводили количественный анализ основных гематологических показателей (абсолютное число лейкоцитов и тромбоцитов в единице объема – мкл) на 7-е, 14-е и 28-е сут наблюдения, полученные данные сравнивали с фоновыми значениями.

Рассчитанные при помощи пробит-анализа по Финни среднелетальная, пороговая и летальная дозы при изолированном облучении животных составили $5,4 \pm 0,2$ Гр, 4,5 Гр и 7,0 Гр, соответственно. При осложнении радиационного компонента поражения механическим были получены следующие результаты: LD_{50} – $4,6 \pm 0,2$ Гр, LD_{16} – 4,0 Гр, LD_{99} – 5,9 Гр, что свидетельствует о проявлении синдрома взаимного отягощения. Профилактическое введение 2-(нафтаден-1-ил,метил)-4,5-дигидро-1Н-имидазола способствовало увеличению пороговых и летальных доз как при изолированном остром радиационном поражении (LD_{50} – $6,3 \pm 0,2$ Гр, LD_{16} – 5,2 Гр, LD_{99} – 8,0 Гр) так и при КРМП, но в меньшей степени (LD_{50} – $5,0 \pm 0,2$ Гр, LD_{16} – 4,2 Гр, LD_{99} – 6,6 Гр).

Установлено, что при изолированном облучении животных в дозе 6,5 Гр выживаемость крыс составила $17,0 \pm 11,0$ %, а на фоне применения радиопротектора исследуемый показатель достоверно увеличился до $42,0 \pm 15,0$ %, . При осложнении лучевого компонента компрессионной травмой тяжелой степени тяжести выживаемость в группах «КРМП» и «РП+КРМП» составила $0,0 \pm 8,0$ % и $8,0 \pm 8,0$ %, соответственно. Профилактическое введение 2-(нафтаден-1-ил,метил)-4,5-дигидро-1Н-имидазола способствовало достоверному увеличению СПЖ крыс как при изолированном облучении животных ($7,8 \pm 0,4$ сут в группе «Контроль (облучение)» и $17,8 \pm 1,8$ сут в группе «РП+облучение»), так и при синдроме длительного сдавливания

на фоне воздействия поражающего фактора лучевой этиологии ($6,3 \pm 0,2$ сут и $10,4 \pm 1,3$ сут, соответственно).

Установлено, что введение РП при облучении крыс в дозе 6,5 Гр и дополнительном воздействии компрессионной травмы способствует увеличению абсолютного числа лейкоцитов относительно контрольной группы («КРМП») на 7-е сут наблюдения. Аналогичные результаты получены и для количественного содержания тромбоцитов в периферической крови животных на 7-е сут после облучения в дозе 6 Гр.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность 2-(нафтален-1-ил,метил)-4,5-дигидро-1H-имидазола при КРМП (СДС тяжелой степени тяжести) по сравнению с изолированным облучением в значительной степени снижается. Вероятно, это связано с особенностями механизмов его радиозащитного действия, в частности, гипоксическим (сосудосуживающим) эффектом, усугубляющим протекание посттравматического периода. В то же время РП способствует увеличению СПЖ животных и повышает радиорезистентность лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. Таким образом, возникает необходимость в поиске средств терапии КРМП, биологически совместимых с радиопротектором и усиливающих его радиозащитный эффект.

Среди цитокинов, активирующих защитные механизмы гемопоэтических клеток и ускорение их дифференцировки, наиболее широко известны рекомбинантные ИЛ-2 и ИЛ-1 β [4]. Однако применение ИЛ-1 β , средства профилактики и экстренной терапии различных форм радиационных поражений, при КРМП не представляется возможным, т.к. беталейкин индуцирует усиление посттравматической острофазовой реакции организма, в том числе секрецию провоспалительных цитокинов. Определенными радиозащитными свойствами обладают гормон роста и его рилизинг-факторы, что делает перспективным их дальнейшее изучение в качестве средств ранней патогенетической терапии.

Список литературы

1. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях // Rus-LASA, НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы. СПб, 2012. 48 с.
2. Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Минздрава России от 19.06.2003 г. № 267.
3. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Бояринцев В.В. Комбинированные радиационные поражения и их компоненты. СПб: Фолиант, 2015. 216 с.
4. Ремизов Д.В. Эффективность интерлейкина-1 как средства профилактики и ранней терапии комбинированных радиационно-механических поражений // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. СПб: Фолиант, 2004. 259 с.

НОРМАТИВНО-ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ РЕГИСТРАЦИИ РАДИОЗАЩИТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

К.С. Семенович

ООО «Специальная и Медицинская Техника», Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: jur.k@yandex.ru

Резюме. Действующая процедура государственной регистрации противолучевых препаратов создает непреодолимые препятствия для вывода лекарственного средства на рынок. В частности, установленная необходимость проведения всех трех фаз клинических испытаний разработанных радиопротекторов не отвечает критериям разумности и допустимости государственных требований. Утверждение упрощенной процедуры регистрации в части сокращения объема клинических испытаний для радиозащитных лекарственных препаратов отвечает приоритетным целям и направлениям государственной регистрации.

Ключевые слова: радиационная безопасность, противолучевые препараты, клинические испытания, обращение лекарственных средств, государственная регистрация.

LEGISLATIVE ASPECTS OF RADIOPROTECTIVE DRUGS REGISTRATION IN THE RUSSIAN FEDERATION

K.S. Semenovich

Special & Medical Equipment LLC, St. Petersburg, Russia,
e-mail: jur.k@yandex.ru

Abstract. The current procedure for radiation protective drugs state registration causes overwhelming obstacles to the medicines launch to the market. Particularly, the established necessity to conduct all three phases of clinical trials of developed radioprotectors does not meet the criteria of reasonableness and admissibility of state requirements. The adoption of the simplified registration procedure for reducing the scope of radioprotective medications clinical trials corresponds to the priority objectives and directions of state registration.

Key words: radiation safety, radioprotective drugs, clinical trials, medicine circulation, state registration.

Немалое значение в обеспечении радиационной безопасности играют средства ее достижения, посредством реализации которых обеспечивается состояние защищенности личности, общества и государства. К мероприятиям по обеспечению радиационной безопасности Федеральный закон от 09.01.1996 № 3-ФЗ «О радиационной безопасности населения» относит, в том числе, меры медико-профилактического характера, предполагающие выполнение работ по повышению защищенности персонала, населения и окружающей среды от радиационного воздействия, совершенствование системы медицинского обслуживания, разработку и производство противолучевых препаратов и создание аварийного запаса лекарств в районах размещения радиационно-опасных объектов [1].

Лекарственные препараты, по общему правилу, подлежат государственной регистрации по установленной Министерством здравоохранения РФ процедуре, после проведения которой они вводятся в обращение на территории Российской Федерации [2]. В состав регистрационного досье, представляемого для регистрации лекарственного препарата, входят разделы токсикологической и фармакологической

документации, включающие в себя отчеты о результатах доклинических исследований лекарственного средства для медицинского применения, и раздел клинической документации, включающий отчеты о результатах клинических исследований лекарственного препарата для медицинского применения. Доклинические исследования лекарственных препаратов проводятся на животных в порядке, предусмотренном Руководством по проведению данных исследований и Правилами надлежащей лабораторной практики [3, 4]. Доклинические исследования проводятся в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства. Проведение доклинических исследований, обычно, не вызывает у разработчиков существенных затруднений, к ним могут привлекаться любые исследовательские организации, имеющие необходимую материально-техническую базу и квалифицированных специалистов в соответствующей области исследования. Между тем, ввиду существенных биологических различий между человеком и животным, экстраполяция данных, полученных по результатам доклинических исследований, на организм человека малоэффективна. В связи с этим, проведения исключительно доклинических исследований лекарственного препарата для безопасного ввода последнего в обращение недостаточно.

Клиническое исследование лекарственного препарата, в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», представляет собой исследование с участием человека, проводимое с целью оценки эффективности, качества и безопасности лекарственного препарата, подлежащего государственной регистрации [5]. Клиническое исследование проводится в отношении физического лица (пациента или здорового добровольца), принимающего участие в клиническом исследовании в составе группы, получающей исследуемый лекарственный препарат, либо в составе контрольной группы [6]. Лекарственное средство проходит несколько фаз клинических испытаний: если на первой фазе исследуется безопасность, биодоступность, физиологическая переносимость препарата здоровыми добровольцами, то уже на второй фазе появляется необходимость применять лекарственный препарат пациентами с заболеванием, для лечения которого предполагается использовать препарат. Таким образом, для формирования регистрационного досье на радиозащитное лекарственное средство на территории РФ, заявитель должен провести клинические испытания такого лекарственного препарата с участием физических лиц, подвергнувшихся воздействию ионизирующего излучения. Очевидно, проведение второй фазы клинических испытаний с позиций первоочередной охраны жизни и здоровья человека труднореализуемо, что становится препятствием для регистрации противолучевого лекарственного средства.

В 2015 году ст. 13 ФЗ «Об обращении лекарственных средств» была дополнена пунктом, предусматривающим особый порядок государственной регистрации лекарственных препаратов, которые предназначены для применения в условиях чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических и радиационных факторов. Между тем, по состоянию на февраль 2018 года такой порядок Правительством РФ не утвержден и в отношении регистрации радиозащитных препаратов продолжают действовать общие условия ввода в обращение. В то же время, необходимость утверждения данного порядка возрастает с каждым днем, не только в целях оперативного противодействия облучению в условиях антропогенных источников радиации, но и в условиях приближающегося расширения космических полетов. Например, в Евросоюзе

(Европейское агентство лекарственных средств) при проведении клинических исследований, лекарственные препараты проверяются не только на эффективность в борьбе с заболеваниями, для которой они разрабатывались, но и на влияние на организм при других неблагоприятных факторах, в том числе при радиационном воздействии.

Государственная регистрация, как элемент публичного права, направлена на защиту жизни и здоровья граждан, потребляющих лекарственные средства. Сложности, возникающие у разработчиков лекарственных препаратов, обусловленные необоснованными и нереализуемыми требованиями действующего законодательства РФ, ставят под сомнение основную цель государственной регистрации, ограничивая поступление на рынок новых необходимых лекарственных средств.

До появления проекта Постановления Правительства РФ и его последующего утверждения, полагаем, что наиболее эффективным способом введения в обращение противолучевых препаратов послужит упрощение процедуры их регистрации. Законом об обращении лекарственных средств, например, для воспроизведенных лекарственных препаратов допускается предоставление в составе раздела клинической документации регистрационного досье, отчета о результатах исследований биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата для медицинского применения, в связи с одинаковой биодоступностью лекарственного средства. При государственной регистрации орфанного лекарственного препарата для формирования раздела клинической документации регистрационного досье представляются отчеты о результатах клинических исследований орфанного лекарственного препарата для медицинского применения, проведенных в Российской Федерации, или отчеты о результатах международных многоцентровых клинических исследований орфанного лекарственного препарата [7]. В отношении же радиозащитных лекарственных препаратов представляется необходимым утверждение порядка, в соответствии с которым для проведения регистрации будет достаточным предоставление отчета о проведении первой фазы клинических испытаний, направленной на проверку безопасности и качества лекарственного средства, при условии проведения доклинических испытаний на крупных лабораторных животных (человекообразных обезьянах), а в части проверки эффективности противолучевого препарата, на наш взгляд, следует ограничиться отчетом о научных исследованиях влияния входящих в состав препарата веществ на характерную для лучевой болезни симптоматику.

Список литературы

1. Федеральный закон от 09.01.1996 № 3-ФЗ «О радиационной безопасности населения» (принят ГД ФС РФ 05.12.1995).
2. Приказ Минздрава России от 21.09.2016 № 725н «Об утверждении Административного регламента Министерства здравоохранения Российской Федерации по предоставлению государственной услуги по государственной регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения».
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К. 2012.
4. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».
5. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (принят ГД ФС РФ .03.2010).

6. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».

7. Приказ Минздрава России от 15.12.2015 № 930н «Об утверждении объема информации, необходимого для формирования раздела клинической документации, при государственной регистрации орфанного лекарственного препарата».

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЦИТОКИНЫ И ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ В АСПЕКТЕ РАДИАЦИОННОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

А.С.Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
Санкт-Петербург, e-mail: simbirtsev@hpb-spb.com

Резюме. Среди генно-инженерных препаратов, обладающих радиозащитными и антитоксическими свойствами, в последние годы особое внимание уделяется препаратам рекомбинантных цитокинов, стимулирующих кроветворение (колониестимулирующие факторы и интерлейкин-1), а также бактериальным производным, способным активировать систему врожденного иммунитета и синтез эндогенных цитокинов (флагеллин и др.). В клинических исследованиях у онкологических больных, перенесших высокодозную радиационную и химиотерапию, применение препарата рекомбинантного интерлейкина-1 бета человека сокращало сроки и глубину лейкопении, приводило к более быстрому восстановлению кроветворения. В перспективе возможно его использование в качестве средства борьбы с последствиями поражения токсическими веществами.

Ключевые слова: радиозащита, интерлейкин-1, флагеллин

RECOMBINANT CYTOKINES AND IMMUNOMODULATORS FOR THE THERAPY OF RADIATION AND CHEMICAL INJURY

A.S.Simbirtsev

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medico-Biological Agency,
St. Petersburg, Russia, e-mail: simbirtsev@hpb-spb.com

Summary. Nowadays several radioprotective and antitoxic preparations are developed using modern biotechnology methods. Among them are recombinant cytokines with hematopoietic activity (colony-stimulating factors and interleukin-1) and bacterial-derived immunomodulators stimulating innate immunity and endogenous cytokine synthesis (flagellin). In clinical trials in patients receiving high-dose anticancer radio- and chemotherapy recombinant human interleukin-1 beta decreased leucopenia duration and led to hematopoietic reconstitution. This medicine could be also used for the therapy of injury caused by different chemical substances.

Key words: radioprotection, interleukin-1, flagellin

Достижения современной биотехнологии позволяют получать различные генно-инженерные препараты, обладающие радиозащитными и антитоксическими свойствами. Среди них в последние годы особое внимание уделяется препаратам рекомбинантных цитокинов, стимулирующих кроветворение (например, колониестимулирующие факторы и интерлейкин-1), а также бактериальным производным, способным активировать систему врожденного иммунитета и синтез эндогенных цитокинов (флагеллин и др.). Именно активация продукции цитокинов служит важнейшим механизмом радиозащитного действия последней группы препаратов, т.к. позволяет им индуцировать синтез сразу нескольких эндогенных ростовых факторов, нужных для постлучевой регенерации тканей и организма в целом. В их ряду одним из главных активаторов костномозгового кроветворения является интерлейкин-1 бета (ИЛ-1). В основе радиозащитного действия интерлейкина-1 лежит активация миелопоэза и других ростков кроветворения, начиная с уровня стволовых кроветворных клеток, и тканевых процессов репарации. Генно-инженерный препарат рекомбинантного ИЛ-1 человека под названием Беталейкин зарегистрирован в РФ в

качестве гемостимулирующего, иммуностимулирующего и радиозащитного средства. Беталейкин стимулирует костномозговое кроветворение, усиливает функции клеток врожденного и приобретенного иммунитета и регенерацию поврежденных тканей за счет активации пролиферации и функциональной активности эпителиальных клеток и фибробластов. В клинических исследованиях у онкологических больных, перенесших высокодозную радиационную и химиотерапию, применение препарата рекомбинантного интерлейкина-1бета человека (Беталейкина) сокращало сроки и глубину лейкопении, приводило к более быстрому восстановлению кроветворения. В экспериментальных исследованиях показано местное ранозаживляющее действие ИЛ-1 при лучевых ожогах. Согласно утвержденной МЗ РФ инструкции по применению препарата, Беталейкин рекомендуется для подкожного введения пострадавшим от острых тотальных и субтотальных аварийных облучений в дозах выше 0,5-1 Гр в течение 2-х часов после лучевого воздействия. В перспективе возможно его использование в качестве препарата индивидуального применения в форме шприц-тюбика как средства экстренной терапии при острых аварийных облучениях человека. При проведении клинических испытаний выяснилось, что Беталейкин защищал кроветворную систему и от воздействия химиопрепаратов, подавляющих кроветворение. Поэтому он может быть использован не только как радиозащитное средство, но и в качестве средства борьбы с последствиями поражения токсическими веществами. Использование генно-инженерных препаратов, производимых с помощью современных биотехнологических методов, при чрезвычайных ситуациях может привести к существенному увеличению числа людей, спасенных от гибели после воздействия радиоактивного излучения и отравляющих веществ.

**ЭФФЕКТЫ БАРОКАМЕРНОЙ АДАПТАЦИИ К ПЕРИОДИЧЕСКОМУ
ДЕЙСТВИЮ ГИПОКСИИ ПРИ ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

А.И. Смолягин, И.Н. Чайникова, Б.А. Фролов, В.П. Твердохлиб
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Оренбург, Россия, e-mail: problab.orenburg@mail.ru

Резюме. В работе исследовано влияние барокамерной адаптации к периодическому действию гипоксии (БАПДГ) на мышей-гибридов (СВА х С57В16)F1 с последующим облучением в дозе 5 и 10 гр. Гипоксическое воздействие в течение 20 дней независимо от высоты подъема (2000 м, 5000м) повышало чувствительность животных к облучению. Наиболее выраженный протективный эффект БАПДГ выявлен при предварительной адаптации мышей в барокамере на «высоте» 5000м в течение 40 дней.

Ключевые слова: адаптация к периодической гипоксии, мыши, облучение

**EFFECTS OF BAROCAMERAL ADAPTATION TO PERIODICAL ACTION
OF HYPOXIA IN THE RADIATION OF EXPERIMENTAL ANIMALS**

A.I. Smolyagin, I.N. Chaynikova, B.A. Frolov, V.P. Tverdokhlib
FGBOOU WAUGH "The Orenburg state medical university" of the Russian Ministry
of Health, Orenburg, Russia, e-mail: problab.orenburg@mail.ru

Summary. The effect of barocameral adaptation to the periodic effect of hypoxia (BAPDG) on hybrid mice (CBAxC57B16) F1 with subsequent irradiation in a dose of 5 and 10 gr was investigated. Hypoxic effects for 20 days, regardless of the height of the lift (2000 m, 5000 m) increased the sensitivity of animals to radiation. The most pronounced protective effect of BAPD was revealed in the preliminary adaptation of mice in the pressure chamber at a "height" of 5000 m for 40 days.

Key words: adaptation to periodic hypoxia, mice, irradiation

В настоящее время по-прежнему актуальным является поиск подходов и средств для лечения и профилактики лучевых поражений организма в эксперименте и клинике. Одним из данных направлений может являться адаптация к гипоксии. Известно, что вопросы адаптации к гипоксии были и остаются в центре внимания у специалистов в области нормальной и патологической физиологии, биологии, биохимии, гематологии и иммунологии, а так же клиницистов различного профиля. В настоящее время достаточно полно изучены разнообразные приспособительные реакции, возникающие при действии гипоксии. В соответствии с концепцией Ф.З. Меерсона, изложенной в многочисленных работах (1980-2000), в ответ на гипоксию, вызванную снижением содержания кислорода, организм реализует в начале срочную, но неустойчивую, а затем устойчивую долговременную адаптацию. Основу такой устойчивой адаптации составляет единый системный структурный след, состоящий из пяти компонентов, определяющих ее главные защитные эффекты. Адаптация к гипоксии, благодаря разветвленному структурному следу, обладает широким спектром защитных перекрестных эффектов, что позволяет ее применять в лечении и профилактике определенных болезней человека [1]. Различают три основных варианта гипоксического воздействия: 1. адаптация в условиях высокогорья; 2. барокамерная прерывистая гипоксическая тренировка; 3. вдыхание газовых смесей с низким содержанием кислорода. Установлен ряд преимуществ и недостатков различных вариантов адаптации к гипоксии. В литературе имеются разноречивые данные по

эффективности различных вариантов адаптации к гипоксии при лучевых поражениях, как в эксперименте, так и в клинике.

Цель - исследовать эффект различных режимов БАПДГ на выживаемость и продолжительность жизни мышей-гибридов (СВА х С57В16)F1 при однократном лучевом поражении в дозе 5 и 10 Гр.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования по изучению влияния БАПДГ проведено на 412 мышах-гибридах самцах (СВА х С57В16)F1, полученных из питомника РАМН "Столбовая". В работе испытаны различные режимы и сроки БАПДГ, а также две дозы облучения: 5 и 10 Гр. Адаптацию животных к гипоксии проводили путем их ежедневного 6-часового пребывания в барокамере на «высоте» 2 км или 5 км по 6 дней в неделю на протяжении 20 или 40 дней после предварительного ступенчатого выведения на эту «высоту». Контрольных животных содержали в том же виварии, но не подвергали БАПДГ. Контрольных и адаптированных мышей подвергали однократному гамма-облучению в дозе 5 Гр или 10 Гр на аппарате Рокус. Результаты оценивали по проценту выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) на протяжении 14 суток после облучения. При этом животные после облучения были разбиты на 2 подгруппы: мыши, у которых продолжался курс БАПДГ на протяжении 14 суток (Б) и мыши, которые после облучения не подвергались повторному воздействию БАПДГ (А).

На первом этапе было изучено влияние бароадаптации на выживаемость мышей, подвергнутых тотальному облучению в дозе 5 Гр. Было установлено, что такая доза облучения не приводила в течение 14 суток наблюдения к гибели неадаптированных животных. Предшествовавшая облучению адаптация к «высоте» 2000 м в течение 20 дней снижала выживаемость животных до 61% при СПЖ 246,3 часов. Адаптация мышей в течение указанного срока к гипоксическому воздействию большей интенсивности – 5000 м не приводила к значимым изменениям показателей выживаемости (63,2%) и продолжительности жизни – 267,7 часов по сравнению с животными предшествующей группы. Пролонгирование курса бароадаптации до 40 дней повышало показатели выживаемости и средней продолжительности жизни животных после облучения при их адаптации к «высоте» как 2000 м (выживаемость 80%; СПЖ 299,4 часов), так и 5000 м (выживаемость 100%; СПЖ 324,0 часов).

В серии опытов с использованием бароадаптации в периоды до- и после (на протяжении 14 суток) облучения в дозе 5 Гр установлено, что продолжение курса гипоксического воздействия на «высотах», соответствующих периоду до облучения (2000 м и 5000 м) способствовало некоторому повышению выживаемости мышей по сравнению с животными, подвергавшимися бароадаптации только до облучения. В частности, этот показатель возрос с 61,1 до 90% (в группах, подвергавшихся предварительной адаптации 20 дней на «высоте» 2000 м), с 80 до 85% (в группах, подвергавшихся предварительной адаптации 40 дней на «высоте» 2000 м) и с 63,2 до 95% (в группах, подвергавшихся предварительной адаптации 20 дней на «высоте» 5000 м). Соответственно, возросли и показатели СПЖ этих животных с 246,3 до 316,5 часов, с 299,4 до 313,5 часов и с 267,7 до 314,1 часов.

При использовании тотального облучения в дозе 10 Гр выживаемость неадаптированных животных в течение 14 дней (контроль) составила 5,6% при СПЖ 163,2 часа. Бароадаптация в течение 20 дней к «высоте» 2000 м или 5000 м, предшествовавшая облучению, не оказывала защитного эффекта на исследуемые показатели, которые не отличались от таковых у контрольных животных. Вместе с тем, адаптация к указанным «высотам» в течение 40 дней характеризовалась повышением

выживаемости мышей соответственно до 80% (2000 м) и 47% (5000 м) и увеличением СПЖ до 287,4 часов и 259 часов. Пролонгирование курса адаптации после облучения не усиливало эти защитные эффекты 40-дневной адаптации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о неоднозначной эффективности использования различных режимов адаптации к гипоксии и доз облучения. Так, при тотальном облучении в дозе 5 Гр, не вызывавшем в течение 14 дней гибели животных, не подвергавшихся гипоксическому воздействию, предварительное использование такого воздействия в течение 20 дней вне зависимости от его интенсивности ($P_{A}O_2$ 10,1 кПа и 5,58 кПа в альвеолярном воздухе) приводило к гибели животных и снижало среднюю продолжительность их жизни. При тотальном облучении в дозе 10Гр, вызывавшем гибель 94,4% неадаптированных мышей в течение 14 дней, аналогичное по сроку и интенсивности ($P_{A}O_2$ 10,1 кПа и 5,58 кПа в альвеолярном воздухе) предварительное гипоксическое воздействие приводило к гибели 100% животных. Увеличение продолжительности предварительной барокамерной адаптации до 40 дней снижало показатели гибели животных и повышало среднюю продолжительность жизни, что наиболее демонстративно проявлялось при дозе облучения в 10 Гр. Использование модели гипоксического воздействия в периоды до- и после облучения ослабляло негативный эффект 20-суточной адаптации на выживаемость животных при дозе облучения 5 Гр и не оказывало существенного влияния на положительный эффект предварительной адаптации в течение 40 дней при дозе облучения 10 Гр. Обобщая полученные результаты можно полагать, что повышение чувствительности мышей к тотальному облучению при предварительной барокамерной адаптации в течение 20 дней могло быть обусловлено неспецифическим стрессорным эффектом как условий пребывания животных в барокамере, так и самим гипоксическим воздействием. Что касается положительного эффекта 40-дневной адаптации, то не исключено, что за указанный период завершалось формирование системного структурного следа, обуславливающего феномен «адаптационной стабилизации структур» (ФАСС). Последний, как известно [2], реализуется в виде повышения устойчивости клеточных структур к различным повреждающим воздействиям, опосредованного мобилизацией факторов антиоксидантной защиты и антиапоптотической резистентности клеток, т.е. факторов противодействующих ведущим механизмам радиационного повреждения.

Список литературы

1. Меерсон Ф.З., Твердохлиб В.П., Боев В.М., Фролов Б.А. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике. М.: Наука, 1989. 70 с.
2. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: Механизмы и защитные эффекты адаптации. М.: Нур. Med. Ltd, 1993. 332 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИКИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ РАДИАЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ СРЕДСТВАМИ НА ОСНОВЕ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ГРИБОВ

*Н.И. Тимохина, *С.Н. Сушко, *Е.М. Кадукова, *Н.Н. Вейкина, *С.В. Гончаров,
*Д.А. Ноздрев, **В.В. Трухоновец*

**ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», Гомель, Республика Беларусь,
e-mail: svetsu50@mail.ru*

**УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины», Гомель,
Республика Беларусь, e-mail: truchanavets@tut.by*

Резюме. Проведены исследования радиопротекторной активности водных экстрактов культивированных грибов *Schizophyllum commune*, *Hericiumerinaceus* и *Pleurotuspulmonarius* в модельных экспериментах на мышах линии Af, облученных в дозе 7 Гр (LD_{50/30}). Установлено, что повышение выживаемости мышей при профилактическом использовании грибных экстрактов положительно коррелирует с пострадиационным восстановлением гемопоэза, определяемом стимуляцией колониеобразования в селезенке, повышением общего содержания и функциональных свойств сывороточного альбумина.

Ключевые слова: облучение, базидиомицеты, радиопротекторы, альбумин, эндогенное колониеобразование, сперматогенные клетки, индекс фрагментации ДНК.

EVALUATION OF PREVENTION AND REDUCTION OF RADIATION DISORDERS IN THE ORGANISM BY REMEDIES BASED ON AQUEOUS FUNGAL EXTRACTS

*N.I. Tsimokhina, *S.N. Sushko, *E.M. Kadukova, *N.N. Veyalkina, *S.V. Goncharov,
*D.A. Nozdryov, **V.V. Trukhonovets*

**Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel,
Republic of Belarus, e-mail: svetsu50@mail.ru*

**Gomel State University named after F. Skaryna, Gomel, Republic of Belarus,
e-mail: truchanavets@tut.by*

Summary. In model experiments on mice line Af irradiated at a dose of 7 Gy (LD_{50/30}) studying the radioprotective activity of aqueous extracts of cultivated mushrooms *Schizophyllum commune*, *Hericiumerinaceus* and *Pleurotuspulmonarius* was carried out. At the prophylactic use of fungal extracts an increased survival of mice was established and accompanied by an increase in a total content of serum albumin and improving its functional properties, and post-radiation recovery of hematopoiesis determined by stimulating colony formation in the spleen.

Key words: irradiation, basidiomycetes, radioprotectors, albumin, endogenous colony formation, spermatogenic cells, DNA fragmentation index

В настоящее время производство грибных препаратов, получаемых из плодовых тел, спор и мицелия культивируемых грибов разных видов возросло. Так называемые полисахаридные иммуномодуляторы, наиболее значительная группа современных лекарственных препаратов из грибов, широко используются в Японии, Китае и странах Юго-восточной Азии как вспомогательные средства для иммунотерапии раковых больных в дополнение к такому основному лечению, как хирургическое удаление опухоли, радиотерапия и химиотерапия. Препараты природного происхождения играют важную роль в системе защиты организма от облучения в малых дозах [1]. Герициум шиповатый (гребенчатый, *H. Erinaceus*) и щелелистник обыкновенный (*Sch. commune*) –

ценные и перспективные лекарственные грибы для получения биологически активных веществ, широко используются в традиционной медицине Китая и Японии.

Цель работы - экспериментальная оценка радиопротекторной активности водных экстрактов культивированных грибов для разработки средств профилактики и коррекции пострadiaционных нарушений организма.

Материал и методы. Работа выполнена на линейных мышах Af обоего пола, которых содержали в условиях вивария Института радиобиологии НАН Беларуси. Использовали виды базидиальных грибов из коллекции культур УО «ГГУ им. Ф. Скорины». В течение 1 месяца ежедневно мыши получали с питьем водный экстракт (ВЭ) плодовых тел и мицелия грибов (250-1000 мг/кг массы) до облучения в дозу 7 Гр на гамма-установке «ИГУР» (источник ^{137}Cs). Дана оценка выживаемости мышей, состояния системы кроветворения, колониеобразования в селезенке, сывороточного альбумина, массовых показателей репродуктивных органов и повреждений ДНК сперматогенных клеток.

Содержание гемоглобина и гематокрит определяли в свежей крови на геманализаторе Celltac α (Nihon Kohden). Эндогенное колониеобразование в селезенке мышей оценивали через 12 сут после острого облучения и употребления ВЭ по методу [2]. Состояние сывороточного альбумина (СА) анализировали методом флуоресцентных зондов в образцах крови с помощью наборов реактивов «ЗОНД-Альбумин» (НИМВЦ «Зонд», Москва) на спектрофлуориметре CM 2203 Solar [3]. Состояние органов репродуктивной системы определяли по относительной массе семенников и эпидидимисов [4], анализ сперматогенных клеток методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) и степени фрагментации ДНК сперматозоидов – DFI [5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов “Statistica 6.0” (StatSoft, Inc) и “SigmaPlot 8.0”. Достоверность различий между группами устанавливали по критериям Стьюдента и Майн-Уитни. Работа выполнена в соответствии с методическими указаниями [6], а также Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г).

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ радиопротекторной активности ВЭ грибов *Sch. commune*, *H. erinaceus* и *Pl. pulmonarius* после их профилактического поступления в течение 1 месяца, проведенный на облученных мышах, отметил среднее (по группам самцов и самок) снижение летальности на 23,0; 19,9 и 19,0% соответственно по сравнению с облученными мышами. Аналогичная схема поступления ВЭ мицелия изученных видов грибов до облучения повысила выживаемость мышей в меньшей степени – на 12,1- 2,1%. Установлены также половые различия: выживаемость облученных самок после приема ВЭ плодовых тел на 14,7; 31,3 и 10,9 % соответственно превысила выживаемость облученных самцов. При исследовании ВЭ мицелия грибов по аналогичной схеме различий не выявлено.

Облучение существенно снижает содержание лейкоцитов в периферической крови, но не изменяет содержания эритроцитов, гемоглобина, метгемоглобина и гематокрит. Профилактический прием ВЭ плодовых тел *Sch. commune* и *Pl. pulmonarius* тормозит в крови окисление гемоглобина в метгемоглобин после облучения на 26 и 14% соответственно по сравнению с группой облучения «7Гр».

Существенная роль в пострadiaционном восстановлении гемопоэза принадлежит селезенке, в которой образуются эндогенные колонии кроветворных клеток, большинство из которых являются эритропоэтическими. Численность эндогенных колоний в селезенке мышей после приема ВЭ плодовых тел *Sch. commune*, *Pl. pulmonarius*, *H. erinaceus* и облучения повысилась по сравнению с группой

облучения соответственно в 1,24; 2,0 и 2,6 раза с максимумом при приеме ВЭН. *erinaceus* (до 6,5 ед/селезенку, $p < 0,01$), одновременно с увеличением площади колоний. Увеличение количества эндогенных колоний при аналогичной схеме поступления ВЭ мицелия грибов более значительное (соответственно в 3,0 – 1,4 раза по сравнению с облученной группой).

Установлено статистически достоверное увеличение эффективной концентрации и резерва связывания сывороточного альбумина, характеризующих количество незанятых центров связывания альбумина, более чем в 1,5 раза, а также снижение интоксикации организма в 2-2,5 раза по сравнению с облученными мышами. Максимальная эффективность выявлена у ВЭ плодовых тел *H. erinaceus*.

Облучение в дозе 7 Гр вызывает значительное снижение массовых показателей органов репродуктивной системы самцов: семенников (на 60%) и эпидидимисов (на 13%). Облучение приводит к практически полной стерильности животных и значительному увеличению индекса фрагментации ДНК - на 93 % ($p < 0,05$), который отражает количество одиночных и двойных разрывов в молекуле ДНК. Применение ВЭ *Sch. commune* способствует повышению данных показателей.

Заключение. Таким образом, профилактическое употребление ВЭ исследуемых грибов оказывает влияние на метаболические процессы в организме. Происходящее при этом повышение выживаемости мышей протекает параллельно с пострadiационным восстановлением гемопоэза, определяемым стимуляцией колониеобразования в селезенке и повышением функциональных свойств сывороточного альбумина, и репродуктивной системы самцов. В качестве профилактических радиопротекторных средств по большинству показателей наиболее перспективным представляется использование ВЭ биомассы плодовых тел *H. erinaceus* и *Sch. commune*, которые являются низкотоксичными, обладают разносторонним адаптогенным действием и оказывают стимулирующее влияние на процесс кроветворения при лучевых поражениях.

Список литературы

1. Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. Комплексная защита от последствий хронического облучения малыми дозами проникающей радиации // Тез. докл. Рос. конф. «Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация. М., 13-14 ноября, 2012, С.14.
2. Воронин А.Ю., Куликов В.Ю. Колониеобразование в селезенках экспериментальных животных под воздействием геомагнитного поля очень низкой напряженности // Бюллетень СО РАМН, № 1 (111), 2004, С. 73-76.
3. Лопухин Ю.М., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Конформационные изменения молекулы альбумина: новый тип реакции на патологический процесс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Т.130, № 7, 2000, С.4-8.
4. Мамина А.П. Метод определения количества сперматогенных клеток семенника в клеточной суспензии / А.П. Мамина, Д.И. Семёнов // Цитология, Т. 18, №7, 1976, С. 913-914.
5. Mahfouz R.Z. Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa / R.Z. Mahfouz, R. K. Sharma, T.M. Said, J. Erenpreiss, A. Agarwal // Fertility and Sterility. 2009. V. 91. № 4. P. 1110-1118.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: Ч.1. / под ред. Миронова А.П. и др., М.: Гриф и К^о, 2012, 944 с.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ТЕЧЕНИЕ ЛУЧЕВОГО ОЖОГА КОЖИ У МЫШЕЙ

Г.А. Тряпицына^{1,2}, *Е.А. Пряхин*¹, *Н.И. Атаманюк*¹, *Ю.И. Остроумов*³,
*Л.Н. Семенкова*³, *А.В. Аклеев*^{1,2}

¹ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА
России, г. Челябинск, Россия; e-mail: tga28@mail.ru

²ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

³ОАО «Институт Инженерной Иммунологии», пос. Любучаны, Чеховский р-н,
Московская обл., Россия

Резюме: Показано благоприятное действие пустых липосом; липосом, содержащих рчАФП; липосом, содержащих рчГКСФ; липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ, на течение лучевого ожога по сравнению с группой облучённого нелеченного контроля по показателям клинической картины патогенеза локального лучевого ожога кожи IIIA степени у мышей стока CD1. Липосомы использовались в качестве средств экстренной профилактики и лечения. Наиболее эффективным оказалось применение липосом, содержащих рчАФП. Увеличение концентрации рчАФП в липосомальном препарате приводило к статистически значимому удлинению скрытого периода, снижению длительности стадий сухого эпидермита, влажного эпидермита, в целом деструктивной фазы, к увеличению длительности репаративной фазы и не влияло на длительность стадии струпа.

Ключевые слова: лучевой ожог, кожа, мыши, рчАФП, рчГКСФ, лечение, липосома

THE INFLUENCE OF ALPHA-FETOPROTEIN ON THE COURSE OF THE RADIATION SKIN BURN IN MICE

G.A. Tryapitsyna^{1,2}, *E.A. Pryakhin*¹, *N.I. Atamanyuk*¹, *Yu.I. Ostroumov*³,
*L.N. Semenkova*³, *A.V. Akleev*^{1,2}

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia, e-mail: tga28@mail.ru

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

³Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow region, Russia

Summary: The favorable effect of the application of empty liposomes; liposomes containing recombinant human protein rhAFP; liposomes containing rhGCSF; liposomes containing rhAFP and rhGCSF on the course of radiation skin burn in comparison with the group of irradiated untreated control was shown according to the clinical pathogenesis picture of local skin burn of IIIA degree in CD1 mice. The liposomes were used as a means of emergency prevention and treatment. The use of liposomes containing rhAFP was the most effective. An increase of the rhAFP concentration in the liposomal preparation leads to a statistically significant lengthening of the latent period, a decrease in the duration of the dry epidermitis stage, wet epidermitis stage, and the destructive phase as a whole, an increase in the reparative phase duration, and did not affect the duration of the eschar stage.

Key words: radiation burn, skin, mice, rhAFP, rhGCSF, treatment, liposome

В настоящее время существует необходимость в разработке новых лекарственных средств для экстренной профилактики и/или лечения местных радиационных поражений кожи [1].

Целью данной работы являлась сравнительная оценка влияния липосом, содержащих рекомбинантные белки человека рчАФП и рчГКСФ, липосом без белков,

липосом только с рчАФП, липосом только с рчГКСФ, а также влияния концентрации рчАФП в препарате на течение лучевого ожога кожи IIIA степени у мышей.

В экспериментах были использованы самцы мышей стока CD1 в возрасте 3-4 месяцев, массой 24-26 г. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали общим правилам работ с использованием экспериментальных животных [2].

Местное радиационное поражение кожи у мышей выполнено в соответствии с ранее разработанной авторами методикой [3] с использованием гамма-установки Государственного лечебно-профилактического учреждения «Челябинский областной клинический онкологический диспансер». Для получения ожога IIIA степени выполнено облучение эпилированного участка кожи спины площадью $1,5 \text{ см}^2$ в дозе 60 Гр (мощность дозы 5,5 Гр/мин).

В первой серии экспериментов тестировали препараты, полученные в ОАО «Институт инженерной иммунологии»: 1) «Пустые липосомы» – суспензия липосом, содержащая 10 мг/мл фосфолипидов (Lipoid S80, Германия); 2) «Липосомы с рчАФП» – суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 1 мг/мл рчАФП; 3) «Липосомы с рчГКСФ» – суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 0,02 мг/мл рчГКСФ; 4) «Липосомы с рчАФП и рчГКСФ» – суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 1 мг/мл рчАФП и 0,02 мг/мл рчГКСФ. Было сформировано 5 групп мышей численностью по 25 животных в каждой.

Во второй серии экспериментов оценивали влияние концентрации рчАФП в липосомальном препарате на течение ожога кожи IIIA степени у мышей. Тестировали препараты «Липосомы с рчАФП и рчГКСФ»: 1) суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 0,1 мг/мл рчАФП и 0,02 мг/мл рчГКСФ; 2) суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 0,5 мг/мл рчАФП и 0,02 мг/мл рчГКСФ; 3) суспензия липосом, содержащих 10 мг/мл фосфолипидов, 1 мг/мл рчАФП и 0,02 мг/мл рчГКСФ.

Трансдермальную аппликацию проводили во всех экспериментальных группах по одной и той же схеме: препараты на место радиационного воздействия наносили однократно через 5 минут после облучения, затем ежедневно в течение 5 суток и далее на 7, 9, 11, 13 сутки после облучения – всего 10 введений. Животным в группе облучённого контроля по той же схеме наносили физраствор. Трансдермальное нанесение 180-200 мкл липосомальных препаратов и физраствора на кожу мышей проводили с использованием дозатора-распысквателя.

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно после облучения в течение 60 суток. Оценивали и регистрировали в журнале визуальные признаки локального радиационного поражения кожи. Каждый день проводили фотографирование зоны лучевого ожога у мышей с целью объективного документирования клинических проявлений лучевого поражения кожи. Каталогизацию, просмотр и обработку фотографий проводили с помощью программы Adobe Photoshop Lightroom CC 2014. Для каждого животного по визуальным наблюдениям и фотоматериалам рассчитывали среднюю арифметическую величину и ошибку длительности деструктивной и репаративной фаз, а также отдельных периодов этих фаз [4]. Деструктивная фаза включает латентный период, период сухого эпидермита, период влажного эпидермита; репаративная фаза включает период струпа, период эпителизации ожоговой раны. Достоверность отличий показателей в экспериментальных группах определяли с использованием t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

В первой серии экспериментов при нанесении на место радиационного поражения кожи пустых липосом регистрировалось уменьшение времени полного заживления на 25%, удлинение скрытого периода на 25%, укорочение периода

влажного эпидермита на 28%, периода струпа - на 30%, периода эпителизации - на 36% и, в целом, репаративной фазы - на 33% относительно показателей в группе облучённого контроля (приведены только статистически значимые отличия от облучённого контроля). В группах, где использовали липосомы, содержащие белки, наиболее выраженные положительные эффекты регистрировались при применении липосом, содержащих рчАФП: на 70% увеличивалась длительность скрытого периода, на 50% уменьшалась длительность периода влажного эпидермита, на 32% длительность репаративной фазы и общее время заживления ожога уменьшалось на 44%. У животных, которым на место ожога наносили липосомы, содержащие рчГКСФ, общее время заживления ожоговой раны и отдельных периодов практически не отличалось от данного показателя в группе «Пустые липосомы». В группе, где использовали для лечения липосомы, содержащие рчАФП и рчГКСФ, все показатели имели близкие значения к показателям в группах «Пустые липосомы» и «Липосомы, содержащие рчГКСФ». Длительность периода сухого эпидермита во всех экспериментальных группах не имела статистически значимых отличий от показателя облучённого контроля.

Во второй серии экспериментов применение липосомального препарата, содержащего белки рчАФП и рчГКСФ, привело к достоверному сокращению длительности восстановления эпителия после облучения кожи в дозе 60 Гр практически в 1,5 раза по отношению к облучённому нелеченному контролю во всех трёх по содержанию рчАФП дозовых группах. Однако динамика формирования и заживления ожоговой раны имела свои особенности в зависимости от содержания в липосомальном препарате рчАФП. Регрессионный анализ показал, что увеличение концентрации рчАФП в липосомальном препарате приводило к увеличению длительности скрытого периода ($p = 0,053$; $F = 4,1$), снижению длительности стадий сухого эпидермита ($p < 0,0001$; $F = 16,2$), влажного эпидермита ($p < 0,024$; $F = 5,7$), в целом деструктивной фазы ($p < 0,0001$; $F = 24,4$), к увеличению длительности репаративной фазы ($p = 0,016$; $F = 6,6$) и не влияло на длительность стадии струпа ($p = 0,766$; $F = 0,390$).

Выводы:

1. По показателям клинической картины патогенеза лучевого ожога кожи IIIА степени у мышей применение в качестве средств экстренной профилактики и лечения пустых липосом; липосом, содержащих рчАФП; липосом, содержащих рчГКСФ; липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ, оказывало благоприятное действие на течение лучевого ожога по сравнению с группой облучённого нелеченного контроля. Наиболее эффективным оказалось применение липосом, содержащих рчАФП.
2. Увеличение концентрации рчАФП в липосомальном препарате приводит к статистически значимому удлинению скрытого периода, снижению длительности стадии сухого эпидермита, влажного эпидермита, в целом деструктивной фазы, к увеличению длительности репаративной фазы и не влияет на длительность стадии струпа.

Список литературы

1. Zhang Y., Zhang S., Shao X. Topical agent therapy for prevention and treatment of radiodermatitis: a meta-analysis. // Support Care Cancer 2013. V. 21. №4. P. 1025-1031.
2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными». Рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. 48 с.

3. Тряпицына Г.А., Атаманюк Н.И., Обвинцева Н.А. и др. Методика получения местного радиационного поражения кожи у мышей с использованием установки Кибер-Нож // Вопросы радиационной безопасности. 2016. №1. С. 47-52.
4. Тряпицына Г.А., Пряхин Е.А., Атаманюк Н.И., и др. Методика определения периодов патогенеза лучевого ожога кожи у мышей по клиническим показателям с использованием фотонаблюдения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. № 5. С. 495-504.

ФАРМАКОХИМИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА В ДАЛЬНЕМ КОСМОСЕ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД

И. Б. Ушаков, М. В. Васин

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства РФ, Москва, Россия, e-mail: iushakov@fmbcfmba.ru

Радиационная обстановка для космонавтов при длительных космических полетах обусловлена воздействием на космический корабль низкоинтенсивного излучения галактических и солнечных космических лучей. При небольшой вероятности возникновения периодов высокой солнечной активности при длительном космическом полете есть угроза облучения космонавтов в дозах, вызывающих детерминированные эффекты радиации. Среди радиопротекторов препарат Б-190 (индралин) наиболее перспективен из небольшого числа других противолучевых препаратов, разрешенных для применения человеком. Из профилактики и купирования первичной лучевой реакции представляет интерес противорвотное средство латран (ондансетрон). Применение радиомитигаторов (рибоксин и др.) в условиях воздействия протонного излучения повышенной солнечной активности позволяет ускорить пострadiационные восстановительные процессы в кроветворной ткани. В качестве средства патогенетической терапии острой лучевой болезни предложен нейпомакс. Природные антиоксиданты, препараты и пищевые добавки в качестве радиомодуляторов, полноценное качественное питание с включением растительных продуктов, обогащенных флавоноидами и витаминами С, Е и каротином, потенциально способствуют предотвращению сокращения биологического возраста космонавтов при длительных полетах под действием солнечных и галактических космических лучей и стрессорных факторов космического полета.

Ключевые слова: космическое излучение, пилотируемые космические полеты, противолучевые средства, индралин, латран (ондансетрон), нейпомакс (филграстим), природные антиоксиданты

PHARMACOCHEMICAL PROTECTION IN FAR SPACE: MODERN VIEW

I.B. Ushakov, M.V. Vasin

1. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. e-mail: iushakov@fmbcfmba.ru

Radiation situation for cosmonauts over long-term space flights is caused by low-rate radiation of galactic cosmic rays and solar cosmic rays. During interplanetary expedition periods the small probability of raised solar activity there is a threat of exposure to astronauts at doses that cause deterministic radiation effects. B-190 (indralin) is the most perspective from a small number of other radioprotectors permitting for men administration. Antiemetic agent latran (ondansetron) is most interesting among preparation for prophylaxis and reduction of prodromal radiation reaction. To accelerate post-radiation hematopoietic recovery after raised solar activity an administration of radiomitigators (riboxin et al.) is substantiated. Neupomax (neupogen) is recommended as a preparation for pathogenesis therapy of acute radiation syndrome. Natural antioxidants, nutrients as radiomodulators, fully qualitative nutrition including vegetable food enriched avonoids, vitamins C, E and carotene potentially prevent a shorten of cosmonaut biological age induced by solar cosmic rays and galactic cosmic rays and stress factors of long-term cosmic voyages.

Key words: space radiation, manned space flights, radiation protective agents, indralin, latran (ondansetron), neupomax (lgrastim), natural antioxidants

При космических полетах радиационное воздействие возможно от радиационного пояса Земли, вне магнитного поля Земли оно связано с

низкоинтенсивным изотропным галактическим космическим излучением (ГКЛ) и с солнечными космическими лучами (СКЛ) во время развития стохастически распределенных солнечных протонных событий (СПС), опасных по своей интенсивности в периоды высокой солнечной активности (СА). ГИ по своей интенсивности до 1 мкГр/мин состоит из протонов (85%) с энергией от 100 до 10^{11} МэВ, альфа-частиц (14%), из тяжелых частиц с атомным весом до 40 (1%) с максимальной энергией до 200-500 МэВ и потока электронов (2%). Среди тяжелых частиц подавляющее место занимают атомы углерода, азота и кислорода (0,83%) далее следуют атомы лития, бериллия и брома (0,23%), и к наиболее тяжелым частицам относятся атомы железа (0,05%).

Периоды максимума СА повторяются с 11-летним циклом. СКЛ состоят из протонов (92-96%) с энергией до несколько МэВ, ядер гелия (4-6%) и тяжелых ядер (1-2%). Околоземной радиационный пояс представлен в подавляющем числе протонами с энергией до 100 МэВ и электронами до 10 МэВ. Увеличение толщины защитного материала в противорадиационных укрытиях может привести к более интенсивному, подавляющему по составу потоку нейтронов, при которых в случае равных поглощенных доз эффективная доза возрастает в 20-40 раз.

Реальные лучевые нагрузки у космонавтов при самых длительных по продолжительности космических полетах на околоземной орбите (365 и 458 дней, 2,2 года) при средней мощности дозы излучения 0,4 мГр/сут составили 13, 17.5 и 32 сГр. При всей неопределенности по радиационной обстановке при длительных космических полетах вне магнитного поля Земли на трассе к планете Марс для здоровья космонавтов представляют угрозу не только риск стохастических эффектов ионизирующего излучения, но и возможность детерминированных эффектов радиации, не исключая проявления острых лучевых поражений. При развитии мощных СПС реальные эквивалентные дозы за событие за малой толщиной защиты могут достигать среднелетальных доз LD_{50} для костномозгового синдрома 3 Зв с учетом ОБЭ протонов, близкого к 1,5 (1-4) при энергии частиц более 30 МэВ, поскольку протоны с более низкой энергией не проходят через реальную защиту космического корабля (КК) или станции. Уровни планируемой дозы облучения в течение месяца достигают 0,25 Гр-экв, а в течение года 0,5 Гр-экв для небольших соматических проявлений под действием радиации со стороны кроветворной системы. Соответствующие величины для ЦНС для полетов в течение месяца и года установлены равными 0,5 Гр-экв и 1 Гр-экв. Для тяжелых частиц ($Z > 10$) по реакции ЦНС ограничение для годового полета осуществляется по поглощенной дозе, которая должна быть менее 0,1 Гр.

При подобном сценарии необходимо иметь доступные для космического корабля противорадиационные контрмеры по защите космонавтов. Среди средств индивидуальной защиты могут быть предусмотрены противолучевые лекарственные препараты и частичное экранирование отдельных участков тела, обеспечивающее наилучшие условия для пострadiационного восстановления радиочувствительных тканей организма. Вопрос о необходимости иметь индивидуальные медицинские средства защиты от поражающего действия радиации возник, начиная с первых космических полетов. Задачи по разработке противолучевых средств для космонавтов впервые решались в Институте авиационной и космической медицины МО и Институте Биофизики Минздрава СССР. У истоков решения данной проблемы стоял отечественный радиационный фармаколог проф. П. П. Саксонов.

Среди радиопротекторов препарат Б-190 (индралин) наиболее перспективен из небольшого числа других противолучевых препаратов, разрешенных для применения человеку. Помимо своей высокой противолучевой эффективности и большой широте радиозащитного действия препарат Б-190 хорошо переносится, в том числе при

воздействии на организм экстремальных факторов полета. Препарат Б-190 не снижает работоспособность человека, оцениваемой по сдвигам в деятельности нейромоторного аппарата (способность к динамической работе, статическая выносливость, тремор покоя и движения, сенсомоторная реакция). Радиопротектор не оказывал влияния на работоспособность оператора, которую оценивали по управлению в режиме одномерного компенсаторного слежения с регистрацией ошибок управления.

Препарат Б-190 по вызываемому им гипоксическому эффекту в радиочувствительных тканях обладает у человека противолучевым действием при оптимальных условиях его реализации, равным по ФУД 1,3-1,5. Входя из его эффективности в опытах на собаках при воздействии протонов высокой энергии ФУД индралина у человека можно ожидать в этих условиях не более 1,3. Обоснованием его применения может служить обнаружение интенсивности протонного излучения более 1 сГр/мин. Если необходимо, препарат Б-190 применяется повторно через 1 ч в дозе 0,45 г внутрь (по 3 табл. тщательно их разжевывая и запивая водой). Для перекрытия всей продолжительности СПС необходимо предусмотреть комплексное применение противолучевых препаратов и индивидуальных средств локальной защиты. Один из рассмотренных вариантов является через полчаса после препарата Б-190 прием таблеток рибоксина в дозе 0,8 г внутрь через каждые 8 ч в течение нескольких дней, пока не завершится СПС. Максимально ожидаемая эффективность рибоксина у человека в дозе 2,4 г близка по ФУД 1,15. Тем не менее, можно ожидать, что при снижении дозы до 0,8 г противолучевой эффект рибоксина не будет превышать по ФУД 1,1 при суммарной дозе облучения в диапазоне от 2 до 4 Гр. Рибоксин относится к средствам повышающих неспецифическую резистентность организма, действуя при низкоинтенсивном излучении как радиомодулятор, эффективен при применении до и после облучения, при повторном применении повышает свои противолучевые свойства. Как радиомитигатор в перспективе интересен препарат NemaMax (rhIL-1-12). В таком же качестве может рассматриваться Neulasta (пегфилграстим, rhG-CSF), который вводится двукратно на 1-ый и 8-ой день после облучения.

При достижении кумуляции дозы протонного излучения выше 0,5 Гр возможны проявления первичной лучевой реакции. В этом случае для профилактики проявления тошноты и рвоты принимается антиэметик лантан (ондансетрон). Диарея при первичной лучевой реакции встречается у 20% пострадавших при тяжелых формах заболевания. Для ее устранения принимают латран. При развитии острой лучевой болезни применяется нейпомакс (филграстим, rhG-CSF), который вводится подкожно ежедневно на фоне антибиотикотерапии до начала выздоровления больного. Нейпомакс предопределяет усиление миелопоэза и способен снизить выраженность лейкопении радиационной природы. Принятая тактика лечения острой лучевой болезни на основе антибиотикотерапии без применения ростовых факторов позволяет по оптимистическим оценкам обеспечить выживаемость больных с тяжелой формой заболевания, близкой по ФУД к 1,2-1,3. Ростовые факторы в терапии острой лучевой болезни существенно повышает ее эффективность: по фактору ФУД до 1,6-1,7. По этой причине сочетанное применение противолучевых средств защиты и современной терапии при возникновении солнечных вспышек может снизить риск тяжелых форм ОЛБ с предварительной оценкой по ФУД, близкому к 1,5-2,0.

Природные антиоксиданты, препараты и пищевые добавки на их основе в качестве радиомодуляторов, полноценное качественное питание с включением растительных продуктов, обогащенных флавоноидами и витаминами С, Е и каротином потенциально способствуют предотвращению сокращения биологического возраста космонавтов при длительных полетах под действием СКЛ и ГКЛ и стрессорных факторов космического полета.

ЭТАНОЛ КАК ФАКТОР, МОДИФИЦИРУЮЩИЙ РАДИАЦИОННОЕ ПОРАЖЕНИЕ МОЗГА

В.П. Федоров¹, И.Б. Ушаков²

¹ФГБВОУ ВО «Воронежский государственный институт физической культуры», Воронеж, Россия; ² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, E-mail: fedor.vp@mail.ru

Резюме. В экспериментах на крысах, подвергшихся гамма облучению головы с предшествующим или последующим введением этанола изучены церебральные эффекты. Показано, что оба фактора вызывают сходные изменения неврологической симптоматики и нейроморфологических эффектов. Этанол до облучения существенно не модифицировал состояние нейронов, но вызывал появление синапсов, дегенерирующих по филаментарному типу. После облучения этанол в пороговой дозе не изменял, а больших дозах усиливал радиационные изменения нейронов и синапсов.

Ключевые слова: облучение, этанол, головной мозг, нейроны, синапсы, комбинированное действие этанола и гамма облучения.

ETHANOL AS A FACTOR MODIFYING THE RADIATION DAMAGE OF THE BRAIN

V.P. Fyodorov¹, I.B. Ushakov²

¹Voronezh State Institute of Physical Culture, Voronezh, Russia

²Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia E-mail: fedor.vp@mail.ru

Summary. Cerebral effects were studied in experiments on rats exposed to gamma irradiation of the head with prior or subsequent administration of ethanol. It is shown that both factors cause similar changes in neurological symptoms and neuromorphological effects. Before irradiation ethanol did not significantly modify the state of neurons, but caused the appearance of synapses with more pronounced degeneration. After irradiation, ethanol in the threshold dose did not change but in large doses increased radiation changes of neurons and synapses.

Key words: irradiation, ethanol, brain, neurons, synapses combined effect of ethanol and gamma irradiation.

Несмотря на принятие различных запретительных мер, алкоголь издавна является неременным спутником военных конфликтов. Вполне вероятно, что и в мирное (аварии на АЭС) могут возникнуть массовые экстремальные ситуации, порождающие различные типы поведения человека. Осведомленность о фармакологической активности этанола в плане "коррекции" психоэмоционального статуса, а также доступность препарата позволяют предположить, что частота его применения в указанных ситуациях у отдельных категорий лиц возрастет. "Что же касается спирта, то в атомном деле ему отводилось место особое. Спирт не просто опьянял и блокировал страх перед радиацией. Он и защищал, на время связывая собою свободные радикалы молекул в клетках человеческого организма, не давая им тем самым необратимо "окультялиться"... Пошло это еще с первых лет ядерного штурма, когда никаких других протекторов медицина не знала. Да так и вошло в привычку" [1]. Не стали исключением и чернобыльские события [2, 3, 4].

Изложенные предпосылки с учетом почти полного отсутствия сведений о комбинированном влиянии этанола и облучения на поведение и работоспособность ликвидаторов последствий чернобыльской радиационной аварии обусловили цель исследования - анализ влияния различных доз алкоголя на радиocereбральные эффекты.

Эксперимент проведен на 56 белых крысах-самцах линии Вистар массой 250—270 г, голову которых облучали у-квантами от источника ^{60}Co в дозе 50 Гр при мощности дозы 6,7 сГр/с, а также с внутривентриальным введением 15 % раствора этанола из расчета 0,28 и 2,25 г на 1 кг массы. Дозы этанола были выбраны как «крайние» (пороговая и транквилизирующая) по механизму действия на ЦНС [1, 5]. За 2 мин до или сразу после облучения крысам внутривентриально вводили этанол в указанных дозах. Контролем служили животные, подвергшиеся ложному облучению и введению этанола. Материал (сенсомоторная кора, гиппокамп, тригеминальный узел) забирали через 1,7 ч после воздействия. Кусочки головного мозга фиксировали в растворе Бекера и пропаноле, обезвоживали и заливали в парафин. Обзорные срезы окрашивали по Нисслю и гематоксилин-эозином. Для ультраструктурных исследований материал фиксировали методом инфильтрации в 2,5 % растворе глутаральдегида на 0,2 М коллидиновом буфере, обеспечивающим быстрое проникновение фиксатора в вещество мозга, постфиксировали в 1 % растворе осмиевой кислоты на том же буфере, обезвоживали в этаноле и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (Швеция), контрастировали цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе IEM-100 CX-II (Япония). В отдельных случаях для фиксации использовали метод перфузии, вводя фиксатор через левый желудочек сердца.

Установлено, что оба фактора (облучение и этанол) вызывают при изолированном действии сходные по выраженности и временной динамике изменения дееспособности и полное симптоматическое подобие [6, 7]. Неврологической симптоматике в обеих случаях соответствует комплекс типовых неспецифических структурно-функциональных эффектов, заключающихся в изменении соотношения нервных клеток различных типов (нормо-, гипо- и гиперхромных, а также пикноморфных и клеточных теней), изменении объемов тела ядра, ядрышка нейронов и их соотношений, а также в выраженности функциональных и деструктивных изменений. При этом картина состояния органоидов и мембранных структур нейронов свидетельствует, что в основе действия обоих факторов лежит гипоксия, как типовой нейрпатологический процесс. Наиболее четко схожесть нейроморфологических эффектов изучаемых факторов получена по картине временной динамики изменений синапсов, когда синхронно проявляются их изменения по светлomu, темному, очаговому или филаментарному типу.

Эффекты комбинированного действия изучаемых факторов зависели от последовательности их воздействия и дозы этанола. Так, введение этанола до облучения головы существенно не модифицировало радиационные изменения синапсов, но вызывало появление синапсов, дегенерирующих по филаментарному типу. Подобное явление ни в одной из экспериментальных групп не встречалось. Этанол в дозе 0,28 г/кг после облучения головы не оказывал влияния на радиационные поражения синапсов. При действии больших доз алкоголя (2,25 г/кг) наблюдалось некоторое усиление действия ионизирующего излучения: при сохранении числа измененных синапсов в них отмечаются более выраженные изменения. При анализе суммарной частоты функциональных и деструктивных изменений оказывается, что этот показатель достоверно больше, чем в группе облучения. В 67 % случаев наблюдался распад митохондрий в пресинаптических отделах и не более чем в 11% - в других группах. Деструкция митохондрий происходит, видимо, очень быстро, так как

один их полюс выглядит набухшим, а второй сохраняет плотно упакованные кристы. Типичным является изменение внутренней мембраны митохондрий, которая закручивается в миелоноподобные мембранные комплексы. Такое состояние митохондрий может привести к существенному нарушению процесса выработки энергии и затруднению функции синапсов. Интересно отметить, что этанол вызывает и определенный «провоцирующий» эффект отека-набухания структур синапсов. При этом минимальная концентрация этанола сама не вызывала сдвигов в гидратационном профиле мозга, но при действии после облучения обуславливала его появление. Концентрация этанола 2,25 г/кг уже сама по себе приводила к гипергидратации, а после облучения отек — набухание было существенно выражено. Увеличение содержания воды хорошо коррелирует с выявляющимся при ультраструктурном исследовании набуханием нейронов и их синапсов.

Таким образом, в действии этанола и гамма облучения на структурно-функциональное состояние головного мозга крыс наблюдается определенное сходство, а при комбинированном последовательном действии этих факторов отмечается синергизм. Этанол усиливает частоту и выраженность неврологической симптоматики при радиационном поражении мозга и вызывает более грубые изменения синапсов, связанные, по-видимому, с нарушением энергообеспечения и гипергидратацией особенно при введении этанола после облучения. В связи с этим этанол по его механизму действия, ближайшим и отдаленным соматическим, а также генетическим последствиям не может служить ни профилактическим ни лечебным противорадиационным средством.

Список литературы

1. Ушаков И.Б., Лапаев В.Э., Воронцова З.А. Алкоголь и радиация (очерки радиационной наркологии или радиационный Чернобыль). Воронеж: Издательство «Истоки», 1998. 248 с.
2. Пострелко В., Черный А. Чернобыльская катастрофа и алкоголь: клиника, эпидемиология и лечение. LAPLAMBERT Academic Publishing, 2013. 75 с.
3. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Малые радиационные воздействия и мозг. Воронеж: «Научная книга», 2015. 536 с.
4. Федоров В., Ушаков И., Федоров Н. Церебральные эффекты у ликвидаторов Чернобыльской аварии. LAPLAMBERT Academic Publishing, 2016. 390 с.
5. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Ранние изменения интегративных систем головного мозга крыс при сочетанном действии этанола, и гамма облучения // Мед. радиология. 1988. Т. 33. №10. С. 50-56.
6. Разводовский Ю. Е. Алкогольное поражение мозга // Медицинские новости. 2006. № 1. С. 13-17.
7. Федоров В.П., Ушаков И.Б., Асташова А.Н. Влияние алкоголя на работоспособность авиационных специалистов // Физическая культура, спорт и здоровье в современном обществе: сборник научных статей Всероссийской конференции. Воронеж: «Научная книга», 2016. С. 385 – 394.

ИНГИБИТОРЫ NOS КАК СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

*М.В. Филимонова, А.С. Самсонова, Л.И. Шевченко, Т.С. Корнеева,
В.М. Макаrchук, Е.А. Чеснакова, В.И. Суринова, С.Е. Ульяненко, А.С. Филимонов*

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
Обнинск, Россия, e-mail: mari_fil@mail.ru

Резюме. В экспериментах показано, что ингибитор NOS T1023 эффективно защищает нормальные соматические ткани при локальном воздействии высоких доз γ -излучения – ФИД по острому лучевому ожогу составляет 1,46. Но, в то же время, в малигнизированных тканях солидных опухолей противолучевое действие T1023 практически не реализуется. На моделях лучевой терапии саркомы M-1 у крыс и солидной карциномы Эрлиха у мышей при однократном и гипофракционированном воздействии γ -излучения T1023 достоверно снижало тяжесть острых лучевых повреждений кожи и подлежащих тканей, но не модифицировало лучевые эффекты в отношении неоплазий и не снижало противоопухолевую эффективность радиотерапии. При этом в селективности к нормальным тканям и противолучевой эффективности T1023 не уступало амифостину, но ингибитор NOS обеспечивал эти эффекты при дозах в 2-3 раза менее токсичных, чем амифостин.

Ключевые слова: лучевые повреждения, осложнения радиотерапии, селективная защита нормальных тканей, ингибиторы синтаза оксида азота.

NOS INHIBITORS AS MEANS OF PREVENTION OF RADIOTHERAPY COMPLICATIONS

*M.V. Filimonova, A.S. Samsonova, L.I. Shevchenko, T.S. Korneeva,
E.A. Chesnakova, V.M. Makarchuk, V.I. Surinova, S.E. Ulyanenko, A.S. Filimonov*

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: mari_fil@mail.ru

Summary. In experiments, it was shown that the NOS inhibitor T1023 effectively protects normal somatic tissues after the local exposure of high doses of γ -radiation - the DRF for acute radiation burn is 1.46. But, at the same time, in the malignant tissues of solid tumors, the anti-radiation effect of T1023 practically is not realized. In the models of radiotherapy of M-1 sarcoma in rats and solid Ehrlich carcinoma in mice with single and hypofractionated exposure of γ -radiation, T1023 statistically significantly reduced the severity of acute radiation injuries of the skin and underlying tissues, but did not modify the radiation effects in experimental neoplasia and did not decrease the antitumor efficacy of radiotherapy. At the same time, the selectivity of the anti-radiation effect and the protection efficiency of normal tissues T1023 was equal to amifostine, but the NOS inhibitor realizes these effects at doses 2-3 times less toxic than amifostine.

Key words: radiation damage, complications of radiotherapy, selective protection of normal tissues, inhibitors of nitric oxide synthase.

Несмотря на совершенствование радиологической аппаратуры, методов лучевой терапии и ее планирования, в России и развитых странах мира частота осложнений радиотерапии остается на стабильно высоком уровне – от 10-15% до 40% [1]. Такие осложнения, особенно поздние лучевые повреждения, имеющие, во многом, необратимое течение, слабо поддаются консервативной терапии и не только приносят

страдания пациентам, но и способны даже при излечении онкологического заболевания определять негативный прогноз таких больных на постгоспитальном этапе.

В наших исследованиях ранее была показана способность ингибиторов NOS проявлять свойства гипоксических радиопротекторов [2, 3]. В частности, было установлено, что 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин гидробромид (далее – соединение Т1023), являющийся активным ингибитором eNOS и iNOS, обладает выраженной способностью к профилактике острой лучевой болезни и не уступает в противолучевой эффективности известным радиопротекторам [4, 5].

Целью данных исследований являлось изучение способности соединения Т1023 к селективной противолучевой защите нормальных, немалигнизированных тканей.

Материалы и методы. Исследование включало изучение радиозащитной активности соединения Т1023 в отношении кожи и подлежащих тканей интактных аутбредных мышей при локальном воздействии γ -излучения в дозах 20-35 Гр, и изучение радиомодифицирующих эффектов Т1023 в нормальных и малигнизированных тканях на моделях лучевой терапии саркомы М-1 у крыс Wistar и солидной карциномы Эрлиха (КЭ) у аутбредных мышей при однократном (30-36 Гр) и гипофракционированном (20+20 Гр) локальном воздействии γ -излучения. Лучевое повреждение нормальных тканей изучали по клинико-морфологической картине и течению острой лучевой реакции кожи и прилегающих тканей на облученной конечности. Радиомодифицирующее влияние Т1023 в нормальных тканях оценивали по тяжести острого лучевого ожога, которую количественно оценивали по шкале RTOG-95 [6]. Противоопухолевое действие γ -излучения и радиомодифицирующее влияние Т1023 в малигнизированных тканях оценивали по динамике роста экспериментальных неоплазий, числу излеченных животных и средней продолжительности жизни (СПЖ). В качестве препарата-сравнения использован амифостин.

Результаты и обсуждение. Исследование способности соединения Т1023 к защите нормальных тканей было проведено при локальном воздействии γ -излучения в дозах 20, 25, 30 и 35 Гр на заднюю конечность аутбредных мышей. Было установлено, что Т1023 при однократном введении в дозе 75 мг/кг за 30 минут до облучения объективно выражено и статистически значимо снижало клинико-морфологическую тяжесть острого лучевого ожога при всех использованных дозах γ -излучения. В этом исследовании не наблюдалось влияния Т1023 на воспалительные и регенераторные процессы. У животных контрольных и опытных групп со сходным масштабом и характером лучевых повреждений, независимо от применения Т1023, манифестация ожога, протекание воспаления и регенерации проходили без каких-либо различий. И все наблюдаемые в опыте отличия определялись снижением степени и масштаба лучевой альтерации тканей, то есть, являлись клиническими проявлениями профилактического радиозащитного действия Т1023 в отношении соматических тканей.

Полученные данные позволили провести и оценку эффективности этого радиозащитного действия. Рассчитанная на основе регрессионного анализа оценка *ФИД* составила 1,46 ($1,19 \div 1,85$) и практически совпала с оценкой *ФИД* 1,44 ($1,26 \div 1,65$), полученной ранее для этой дозы Т1023 по выживаемости мышей при общем воздействии γ -излучения [4]. Этот факт свидетельствует, что при воздействии γ -излучения Т1023 в равной степени эффективно защищает как критические органы, так и другие нормальные соматические органы и ткани.

Во всех исследованиях на моделях лучевой терапии саркомы М-1 у крыс и солидной КЭ у мышей при однократном (30-36 Гр) и фракционированном (20+20 Гр) локальном воздействии γ -излучения соединение Т1023 также объективно выражено и статистически значимо снижало тяжесть острых лучевых повреждений кожи и

подлежащих тканей. В то же время, значимой модификации лучевых эффектов в тканях саркомы М-1 и солидной КЭ, растущих на облученной конечности, соединение Т1023 не вызывало. При всех вариантах лучевых воздействий в отношении обеих неоплазий наблюдалось выраженное противоопухолевое действие γ -излучения, статистически неразличимое в группах животных, получавших и не получавших Т1023. Не наблюдалось и ослабления терапевтической эффективности лучевой терапии неоплазий. Применение Т1023 не снижало долю излеченных животных и СПЖ животных, погибших в результате развития опухолей.

Также нами проведено сравнительное изучение селективности к нормальным тканям и противолучевой эффективности соединения Т1023 и амифостина – радиопротектора, допущенного к клиническому применению в качестве средства профилактики осложнений лучевой терапии. Результаты исследования показали, что радиомодифицирующие свойства Т1023 и амифостина в оптимальных радиозащитных дозах не различаются: оба соединения в равной степени эффективно снижали тяжесть острых лучевых повреждений нормальных тканей, и не модифицировали противоопухолевые и терапевтические эффекты γ -излучения в отношении солидной КЭ. В то же время, в опыте имелось и существенное отличие. Амифостин обеспечивал эффективную селективную защиту нормальных тканей в дозе 200 мг/кг, составляющей для мышей 43% ЛД₅₀, а Т1023 – в дозе 75 мг/кг, составляющей для мышей 18% ЛД₅₀, – в 2-3 раза менее токсичной дозе.

Заключение Результаты экспериментов свидетельствуют, что транзитное подавление эндогенного синтеза оксида азота позволяет в значительной мере селективно защищать нормальные, немалигнизированные ткани при однократном и гиподифракционированном воздействии γ -излучения на солидные новообразования, без снижения терапевтической противоопухолевой эффективности. И в этой связи, ингибиторы NOS и, в частности, соединение Т1023 можно рассматривать как перспективную основу для разработки эффективных фармакологических средств профилактики осложнений лучевой терапии.

Список литературы

1. Ильин Л.А. (ред.) Радиационная медицина. Том 2. Радиационные поражения человека. М.: Изд. АТ, ГНЦ Институт биофизики, 2001. 432 с.
2. Филимонова М.В., Проскуряков С.Я., Шевченко Л.И. и др. Радиозащитные свойства производных изотиомочевина с NO-ингибирующим механизмом действия // Радиационная биология. Радиозэкология. 2012. Т. 52, № 6. С. 593-601.
3. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Трофимова Т.П. и др. К вопросу о механизме радиозащитного действия ингибиторов NO-синтаз // Радиационная биология. Радиозэкология. 2014. Т. 54, № 5. С. 500-506.
4. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макаручук В.М. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз Т1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиационная биология. Радиозэкология. 2015. Т. 55, № 3. С. 250-259.
5. Макаручук В.М., Филимонова М.В., Измestьева О.С. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз Т1023: III. Механизмы противолучевого действия *in vivo* // Радиационная биология. Радиозэкология. 2016. Т. 56, № 6. С. 290-297.
6. Wells M., MacBride S. Radiation skin reactions. In: Supportive care in radiotherapy / Churchill Livingstone, 2003. P. 135–159.
7. Kuna P., Krajcovic C. Acute toxicity and radioprotective effectiveness of WR-2721 (Gammaphos) // Cas. Lek. Cesk. 1981. Vol. 120, N 25. P. 776-778.

СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ВНЕДРЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

М.В. Филимонова, А.С. Филимонов

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия, e-mail: mari_fil@mail.ru

Резюме. Необходимость разработки и создания запасов новых эффективных отечественных противолучевых средств не вызывает сомнений. Тем не менее, эта область экспериментальной и клинической фармакологии нуждается, на наш взгляд, в большем внимании и поддержке как со стороны разработчиков, так и государственных структур. В этой связи представляется целесообразной необходимость возобновления деятельности специальной фармакологической комиссии Фармакологического комитета МЗ России, а также четкой фармакологической и юридической регламентации проведения клинических испытаний антидотов и средств радиационной защиты.

Ключевые слова: средства радиационной защиты, клинические испытания, фармакологическая регламентация.

MODERN PROSPECTS OF DEVELOPMENT AND APPLYING OF NOVEL RADIOPROTECTIVE MEANS

M.V. Filimonova, A.S. Filimonov

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: mari_fil@mail.ru

Summary. The necessity to develop and create reserves of new effective anti-radiation means is beyond doubt. Nevertheless, this area of experimental and clinical pharmacology, in our opinion, needs more attention and support from both the developers and government structures. In this connection, it seems expedient to renew the activity of the special pharmacological commission of the Pharmacological Committee of the Ministry of Health of Russia, as well as the clear pharmacological and legal regulation for clinical trials of antidotes and means of radiation protection.

Key words: means of radiation protection, clinical trials, pharmacological regulation.

Реалии нестабильности современного мира, казалось бы, не вызывают сомнений в необходимости разработки и создания запасов новых эффективных противолучевых средств. Тем не менее, эта область экспериментальной и клинической фармакологии нуждается, на наш взгляд, в большем внимании и поддержке как со стороны разработчиков, так и государственных структур. На создание нового лекарственного средства (ЛС), от поиска молекулы до выхода лекарства на рынок, требуется, по западным оценкам, от 6 до 12 лет и от 600 до 1200 миллионов долларов США [1]. Тем не менее, в США, например, несмотря на значительные научные достижения, направленные на разработку безопасных нетоксичных и эффективных средств защиты от острого радиационного синдрома на протяжении последних 60 лет, US FDA (Агентство США по контролю за продуктами и лекарствами) не утвердило ни одного средства борьбы с острым радиационным синдромом (ARS). Несмотря на то, что эта задача относится к наиболее приоритетным для правительства США [2].

В нашей стране в системе обеспечения качества ЛС приняты отраслевые стандарты, действующие на всех этапах продвижения биологически активного вещества к потребителю: GLP (Доклинические исследования, ДКИ), GCP (Клинические

испытания, КИ), GMP (Производство), GDP (Оптовая торговля), GPP (Розничная торговля).

Нормативно-правовое регулирование ДКИ и КИ осуществляется в настоящее время в рамках Федеральных законов РФ от 22.06.1998 № 86-ФЗ «О лекарственных средствах», от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказа МЗиСР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Руководств по проведению доклинических и клинических исследований в редакции 2012 года.

Во времена СССР регулирование эффективности, безопасности и качества ЛС осуществлялось Министерством здравоохранения СССР. Документация по технологии производства и методам контроля качества ЛС поступала в Фармакопейный комитет, где принималось решение о включении ЛС в Фармакопею, а документация по ДКИ и КИ поступала в Фармакологический комитет, дававший заключение о разрешении проведения КИ или заключение о медицинском применении. Конечным результатом этих процедур являлись приказы МЗ СССР о разрешении медицинского применения и о разрешении промышленного производства ЛС.

Списки баз Фармакологического комитета для проведения ДКИ и КИ и список членов Фармакологического комитета, в который входили ведущие специалисты СССР в разных областях медицины, формировались Управлением по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники МЗ СССР.

В современной РФ такое регулирование осуществляется Министерством здравоохранения Российской Федерации, Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (2004-2010 гг.), Департаментом государственного регулирования обращения лекарственных средств МЗ РФ (с 2010 г. по н.в.). Действует Федеральный закон от 22.06.1998 № 86-ФЗ «О лекарственных средствах», который призван сделать значительный шаг на пути международной гармонизации экспертизы и регистрации ЛС в нашей стране. Кроме него, действует ряд федеральных законов с изменениями и дополнениями, а также приказов и подзаконных актов, приводящих к нестыковкам и отсутствию возможности использования единых информационных документов, а в целом – к снижению эффективности использования человеческих и информационных ресурсов в области разработки новых ЛС.

Одним из таких противоречий является неоднозначная ситуация с разработкой антидотов и средств радиационной защиты. С одной стороны, был издан Приказ МЗ РФ №24, Главного военно-медицинского управления Минобороны РФ №34 от 26.01.1998 г. «О создании специальной фармакологической комиссии Фармакологического государственного комитета Минздрава России» в целях совершенствования работ по созданию и внедрению лекарственных средств, используемых при экстремальных обстоятельствах и в интересах военно-медицинской службы. Но в 2000 году был принят Приказ Минздрава РФ № 41 Главного военно-медицинского управления Минобороны РФ N 67 от 07.02.2000 "Об отмене Приказа N 24/34 от 26.01.98", прекративший деятельность специальной фармакологической комиссии Фармакологического комитета МЗ России в связи с невозможностью проведения клинических испытаний антидотов и средств радиационной защиты в соответствии с действующим ФЗ № 86.

В результате в последние два десятилетия в Российской Федерации не было внедрено ни одного нового лекарственного средства этих классов. В это же время за рубежом проводятся достаточно интенсивные работы в этой области. Так, в США в настоящее время FDA финансирует проведение клинических исследований 7 радиопротекторов, радиомитигаторов и средств лечения острых лучевых синдромов.

Для одного из них терапевтическая эффективность была подтверждена и оно уже получило лицензию FDA.

Очевидно, что данный «правовой паралич» в отечественной фармакологии требует неотложного лечения. Тем более, что одним из направлений Стратегии научно-технического развития Российской Федерации является «Противодействие техногенным, биогенным угрозам, терроризму и ... иным источникам опасности для общества, экономики и государства», в котором эффективные и безопасные антидоты и средства радиационной защиты являются важным элементом.

Считаем, что по решению настоящей конференции от Российского радиобиологического общества РАН и Научного совета РАН по радиобиологии необходимо подготовить официальное обращение в Министерство здравоохранения РФ, Главное военно-медицинское управление Минобороны РФ и Совет безопасности РФ о необходимости возобновления деятельности специальной фармакологической комиссии Фармакологического комитета МЗ России, и разработке четкой фармакологической и юридической регламентации проведения клинических испытаний антидотов и средств радиационной защиты.

1. Dimes J.A., Hanson R.W., Grabowski H.G., Lasagna L. The Cost of Innovation in the Pharmaceutical Industry. *J. Health Econom.* 1991, 10: 107-142.
2. Singh V.K., Newman V.L., Romaine P.L.P., Wise S.Y., Seed T.M. Radiation countermeasure agents: an update (2011-2014). *Expert Opin. Ther. Patents.* 2014, 24(11): 1229-1225.

УЧАСТИЕ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ В МЕХАНИЗМЕ РАДИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М.В. Филимонова, Е.С. Евстратова, В.М.Макарчук,

Л.И. Шевченко, А.С. Филимонов, В.Г. Петин

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России), Обнинск, Россия, e-mail: vladimirovna.fil@gmail.com

Резюме. В работе показано, что механизм радиозащитного действия соединения T1023 может реализовываться на физико-химическом этапе формирования радиационного повреждения за счет уменьшения содержания кислорода в тканях. Помимо этого, полученные результаты демонстрируют участие систем пострadiационного восстановления, превращающие потенциально летальные радиационные повреждения в сублетальные, в механизме радиозащитного действия. О существовании такого механизма свидетельствует наличие сигмоидного плеча кривой доза-эффект в области малых доз ионизирующего излучения.

Ключевые слова: радиозащитное действие, мыши, гамма облучение, восстановление, сублетальные повреждения, гипоксия.

PARTICIPATION OF RECOVERY PROCESSES IN THE MECHANISM OF RADIOPROTECTIVE ACTION

M.V. Filimonova, E.S. Evstratova, V.M. Makarchuk,

L.I. Shevchenko, A.S. Filimonov, V.G. Petin

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: vladimirovna.fil@gmail.com

Summary. The results obtained here show that the mechanism of the radio-protective effect of the compound T1023 can be realized at the physicochemical stage of the formation of radiation damage due to the decrease in the oxygen content in tissues. In addition to this mechanism, the data demonstrate the participation of postradiation recovery, transforming potentially lethal radiation damage into sublethal ones, in the mechanism of radioprotective action at the biochemical stage of radiation damage fixation. The existence of this mechanism of action is confirmed by the presence of the sigmoid part of the dose-response curve in the region of low doses of ionizing radiation.

Key words: radioprotective action, mice, gamma radiation, recovery, sublethal damage, hypoxia.

Предположение о связи механизма действия химических радиопротекторов с репарацией повреждений было высказано в связи с гипотезой о так называемой метаболической защите или «биохимическом шоке» [1]. На основании этой гипотезы изменения, возникающие в клетках при действии протектора, могут или увеличивать эффективность действия репарирующей системы, или защищать ее от действия ионизирующих излучений. К похожим представлениям о вкладе процессов восстановления ДНК в механизме действия радиопротектора приходит Е.Ф. Романцев с соавторами [2, 3]. В этих работах показано, что введение аминотиолов в радиозащитной дозе через короткий интервал времени приводит к ингибированию

радиочувствительных биохимических процессов, в результате чего формирование поврежденных молекул уменьшается из-за ингибирования репликации и облегчения процессов репарации.

Было показано, что защитное действие индолилалкиламинов, аминотиоловицистеина почти полностью отсутствует в бактериальных клетках с дефектами в репарационных системах [4]. Авторы этой работы делают вывод, что механизм радиационной защиты, связанный с восстановлением, является главным механизмом в бактериальных клетках. На гаплоидных и диплоидных дрожжевых клетках различного генотипа была изучена эффективность радиозащитного действия цистеина и цистеина [5]. Показана корреляция между радиозащитным действием цистеина и способностью диплоидных клеток к восстановлению; такая корреляция не была обнаружена для дикого штамма и радиочувствительных мутантов гаплоидных дрожжей. На этом основании сделан вывод, что радиозащитное действие препаратов проявляется через рекомбинацию гомологичных хромосом, для которой требуется диплоидное состояние клеток [5].

Для человека известна редкая мутация, приводящая к дефекту всех соматических клеток по глутатионсинтетазе. В экспериментах, проведенных на культивируемых клетках, полученных от таких пациентов, было показано, что уменьшение содержания глутатиона проводило к неполному восстановлению цепей ДНК. В соответствии с рассматриваемым механизмом, эффективность действия радиопротекторов должна быть пониженной, что и было подтверждено в экспериментах [6].

Приведенные данные послужили основой для разработки кинетических схем развития радиационного поражения, в которых значительное внимание уделяется механизму участия пострадиационного восстановления в радиосенсибилизирующем и радиозащитном действии химических агентов [5, 7]. Эти схемы включают процессы ферментативной репарации в механизме модификации радиочувствительности, суть которых сводится к следующему. В результате прямого (квант энергии $h\nu$) или косвенного (радикал $\text{OH}\cdot$) действия ионизирующего излучения на мишень M возникают первичные повреждения M^* , которые могут взаимодействовать с кислородом или донорами электронов. В первом случае формируется необратимое летальное повреждение, во втором случае с некоторой вероятностью α образуется состояние MH , которое само по себе летально, но поддается ферментативной репарации с вероятностью β . Приведенные выше результаты с радиопротекторами качественно объясняются этим механизмом. Действительно, присутствие радиопротекторов в момент облучения повышает вероятность α восстановления повреждения на физико-химическом уровне в одинаковой степени для клеток различного генотипа. Различие же в эффективности защиты клеток способных к восстановлению, и клеток, не обладающих такой способностью, объясняется восстановлением клеток на биохимическом этапе формирования повреждений (вероятность β).

Основные результаты, на которых базировались эти схемы, были получены на про- и эукариотических клетках. Поэтому данная работа посвящена демонстрации участия процессов восстановления в механизме защитного действия на лабораторных животных. Описаны результаты влияния синтезированного в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыбасоединения T1023 (75 мг/кг), являющегося модификатором эндогенного синтеза оксида азота, на выживаемость клоногенных клеток костного мозга мышей ($\text{CBA} \times \text{C}_{57}\text{BL}_{6j}$) при воздействии в дозах 0-2,5 Гр на γ -установке ^{60}Co «Луч-1» при мощности дозы 0,4–0,8 Гр/мин. Животных облучали в группах до 15 особей. Радиопротектор вводили животным путём внутривентральных инъекций за 15–20 минут до облучения. О

противолучевом действии изучаемого соединения судили поотносительному количеству селезёночных колоний, сформированных в контрольной и облученной группах.

Показано, что на физико-химическом этапе формирования повреждений защитный механизм препарата реализуется через гипоксию, - снижение содержание кислорода в тканях. Кроме того, фактор изменения дозы, количественно характеризующий эффективность радиозащитного действия, составляет порядка 1,4 в области больших доз и около 4,0 в области сигмоидного плеча кривых доза-эффект, регистрируемого при малых дозах ионизирующей радиации. Эти данные свидетельствуют о том, что процессы пострадиационного восстановления, переводящие потенциально летальные повреждения в сублетальные, принимают участие в механизме радиозащитного действия изученного соединения на биохимическом этапе реализации радиационных повреждений.

Список литературы

1. Бак З. Химическая защита от ионизирующей радиации. М.: Атомиздат, 1968.
2. Филиппович И.В., Романцев Е.Ф. Вклад процессов репарации ДНК в механизм действия радиопротекторов. Инф. бюл. АН СССР по проблемам радиобиологии. 1978. № 21. С. 50-57.
3. Романцев Е.Ф., Блохина В.Д., Жуланова З.И. и др. Биохимические основы действия радиопротекторов. М.: Атомиздат, 1980.
4. Bresler S.E., Noskin L.A., Stepanova I.M. et al. Mechanisms of the radioprotecting action of chemical compounds of *Escherichia coli* cells. *Molec. Gen. Genet.* 1978. V. 163. № 1. P. 75-85.
5. Petin V.G., Matrenina V.L. Radioprotecting action of chemical compounds on γ -irradiated yeast cells of various genotypes. *Molec. Gen. Genet.* 1981. V.183. № 1. P. 152-157.
6. Revesz L., Edgren M., Nishida T. Mechanisms of inherent radioprotection in mammalian cells/ Modification and Radiosensitivity in Cancer Treatment. / Ed. T. Sugahara. Tokyo: Academic Press. 1984. P. 13-29.
7. ЭйдусЛ.Х., КорыстовЮ.Н. Кислородв радиобиологии. М.: Энергоатомиздат, 1984. 176 с.

РОЛЬ ФАКТОРА РЕПАРАЦИИ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ ОЦЕНКЕ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ БОЛЬНЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ РАДИОЙОДТЕРАПИИ

*И.К Хвостунов, В.В Крылов., А.А Родичев., Н.Н Шепель., Т.Ю Кочетова.,
О.Н Коровчук, В.С. Пятенко, Т.И. Хвостунова*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»
Минздрава РФ, г. Обнинск, Россия,
e-mail: igor.khvastunov@gmail.com

Резюме. Путем цитогенетического обследования больных дифференцированным раком щитовидной железы определена роль фактора репарации лучевых повреждений при оценке побочной дозы внутреннего облучения в процессе радиойодтерапии. Показано, что пренебрежение учетом данного фактора приводит к занижению оценки общей дозы облучения в среднем на 40%. В случае многократных повторных курсов радиойодтерапии данный вывод имеет наиболее существенное значение для предотвращения негативных гематологических последствий.

Ключевые слова: фактор мощности дозы облучения, рак щитовидной железы, побочная доза, цитогенетическое обследование, биодозиметрия

THE ROLE OF RADIATION DAMAGE REPARATION FOR BIOLOGICAL DOSIMETRY OF THYROID CANCER PATIENTS AFTER RADIOIODINE THERAPY

*I.K. Khvastunov, V.V. Krylov, A.A. Rodichev, N.N. Shepel, T.Yu. Kochetova, O.N. Korovchuk,
V.S. Pyatenko, T.I. Khvastunova*

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Obninsk, Kaluga Region, Russia,
e-mail: igor.khvastunov@gmail.com

Summary. The factor of radiation damage reparation has been investigated by means of cytogenetic examination thyroid cancer patients after radioidine therapy with the aim of biological dosimetry. It was found that neglecting the dose-protraction factor results to underestimation of whole body dose by 40% at average. This finding plays the most important role in the case of repeated radioiodine therapy with high accumulated activity of ¹³¹I.

Key words: dose-rate factor, thyroid cancer, side dose, cytogenetic examination, biodosimetry.

Известно, что в ряде случаев фактор репарации лучевых повреждений при оценке дозы общего облучения методом биологической дозиметрии играет существенное значение [1]. К подобным случаям относится оценка побочной дозы внутреннего облучения в процессе радиойодтерапии больных дифференцированным раком щитовидной железы [2]. Метод радиойодтерапии при лечении дифференцированного рака щитовидной железы успешно доказал свою высокую эффективность, однако и он имеет побочные последствия. Они связаны с внутренним облучением радионуклидами радиоактивного йода-131 здоровых тканей организма пациента, в первую очередь, клеток костного мозга.

Цель настоящего исследования состояла в количественной оценке фактора репарации лучевых повреждений при расчете дозы общего внутреннего облучения пациентов методом биологической дозиметрии. Для расчета побочной дозы общего облучения при радиоiodтерапии в настоящей работе применяли метод биологической дозиметрии на основе анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови, который является признанной моделью оценки индивидуальной дозы облучения [3]. Хромосомные aberrации изучались метафазным методом в клетках первого митоза. Нестабильные aberrации в лимфоцитах крови анализировались стандартным методом с окрашиванием хромосом по методу Гимза, а для анализа стабильных aberrаций применяли метод флуоресцентной *in situ* гибридизации с окрашиванием 2, 4 и 12 хромосом. Оценка поглощенной дозы на все тело проводилась с использованием собственной лабораторной калибровочной зависимости частоты aberrаций от дозы с учетом эффекта мощности дозы, оцененного в рамках модели неполной репарации лучевых повреждений лимфоцитов периферической крови [2, 3].

Внутреннее облучение пациента при радиоiodтерапии происходит с низкой мощностью дозы в течение времени, пока радионуклиды распадаются и выводятся из организма. Характерное время облучения, T , сопоставимо или много больше периода репарации повреждений хромосом, τ , что необходимо учитывать при использовании метода биологической дозиметрии по частоте обменных aberrаций. В настоящей работе фактор репарации лучевых повреждений был исследован в рамках линейно-квадратичной модели зависимости частоты aberrаций, Y , от дозы D : $Y=c+aD+G(T)\beta D^2$, где (c, a, β) – коэффициенты дозовой зависимости при остром облучении, $G(T)$ – обобщенный временной фактор Lea-Catcheside эффекта мощности дозы. Для вычисления фактора $G(T)$ была применена модель неполной репарации [3] с параметром полупериода репарации $\tau=2.28$ ч [4] и эффективным временем выведения радионуклидов йода-131, равным 11.4 ч [5]. В результате получили $\langle G(T) \rangle = 0.247$.

В настоящей работе были обследованы 25 больных дифференцированным раком щитовидной железы. Эти больные проходили первичный или повторный курс радиоiodтерапии в клинике МРНЦ им. А.Ф. Цыба (г. Обнинск). В обследованную группу включили 9 пациентов с разовым первичным назначением в пределах (54 – 100) мКи и 16 человек, которые проходили многократное лечение от 2 до 11 курсов, с суммарной активностью от 120 до 950 мКи. В группе первичных пациентов средняя частота радиационных маркеров (дигцентриков+центрических колец) составила 1.45, а у пациентов с повторными назначениями средний прирост частоты маркеров после радиоiodтерапии равнялся 1.95 на 100 клеток. В группе первичных пациентов средняя доза общего облучения составила 0.59 Гр (95% CI: 0.41-0.68 Гр), а при повторных назначениях – 0.63 Гр (95% CI: 0.05-0.96 Гр). Оценка дозового коэффициента по результатам обследования всех пациентов составила (0.238 ± 0.025) мГр/МБк. В группе пациентов с повторными назначениями средний прирост частоты стабильных маркеров (полных и неполных транслокаций) после радиоiodтерапии равнялся 3.45/100 геном-эквивалентных клеток, а средняя доза составила 1.14 Гр (95% CI: 0-1.68 Гр).

Оценка величины $G(T) \approx 0.25$, полученная в настоящей работе, основана на среднем времени полувыведения радионуклидов йода-131 $\tau=11.4$ ч с межиндивидуальной вариацией этого параметра от 7 до 24 ч [5]. По этой причине оценка $G(T)$ тоже может варьироваться от 0.18 при $\tau = 24$ ч до 0.32 при $\tau = 7$ ч. По данным литературы характерные значения частоты дигцентриков у обследованных пациентов после радиоiodтерапии принадлежат диапазону (1 – 5) диц./100 клеток. Допустим, $Y = 3.0$ диц./100 клеток, тогда при $G(T) = 0.25$ и дозовой зависимости $Y = 0.05 + 1.54 \cdot D + 4.92 \cdot G(T) \cdot D^2$ [1] доза $D = 1.05$ Гр. Соответственно, при $G(T) = 0.18$, $D = 1.16$ Гр, а при $G(T) = 0.32$, $D = 0.97$ Гр. Таким образом, погрешность оценки дозы за

счет неопределенности модельных параметров вследствие межиндивидуальных различий обследованных пациентов не превышает 10%. Иная ситуация возникает в случае, когда не учитывается фактор репарации лучевых повреждений (эффект мощности дозы). Так при $G(T) = 1.0$, $D = 0.63$ Гр, что означает занижение оценки дозы на 40% (т.е. в 1.7 раза). С увеличением частоты радиационных маркеров при больших лучевых нагрузках степень занижения дозы еще более возрастает.

Разработанная в настоящем исследовании методика расчета дозы по частоте хромосомных aberrаций учитывает репарацию лучевых повреждений (эффект мощности дозы) путем оценки фактора $G(T)$ по современной модели неполной репарации [2]. Корректный учет указанного фактора позволяет устранить систематическое занижение дозы общего облучения на величину порядка 40%. В случае многократных повторных курсов радиоiodтерапии данный вывод имеет наиболее существенное значение для предотвращения негативных гематологических последствий.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Калужской области (проект № 18-44-4000041 p_a)

Список литературы

1. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies / International Atomic Energy Agency. - Vienna, 2011. IAEA-EPR, 229 pp.
2. Khvostunov I.K. et al. Cytogenetic biodosimetry and dose-rate effect after radioiodine therapy for thyroid cancer // Radiation and Environmental Biophysics. 2017. Vol. 56, № 3. P. 213–226.
3. Dale R.G., Fowler J.F., Jones B. A new incomplete-repair model based on a 'reciprocal-time' pattern of sublethal damage repair // Acta Oncologica. 1999. Vol. 38, № 7. P. 919–929.
4. Bhat N.N., Rao B.S. Dose rate effect on micronuclei induction in cytokinesis blocked human peripheral blood lymphocytes // Radiation Protection Dosimetry. 2003. Vol. 106, №1. P. 45–52.
5. Willegaignon J. et al. ^{131}I effective half-life (T_{eff}) for patients with thyroid cancer // Health Phys. 2006. Vol. 91, № 2. P.119 –122.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРА NOS В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ

Е.А.Чеснакова, М.В.Филимонова, В.М.Макарчук, А.С.Самсонова, Т.С.Корнеева, В.И.Суринова, Л.И.Шевченко, А.С.Филимонов, Л.П.Ульянова

МРНЦ им. А.Ф.Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия,

e-mail: ches.ekaterina2010@yandex.ru

Резюме. Показана высокая радиозащитная эффективность ингибиторов NOS при их использовании в малотоксичных дозах (1/8 ЛД₁₆) на моделях острого тотального облучения и комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП). Введение ингибиторов NOS животным до радиационного воздействия повышало до 60-75% выживаемость животных и в 3-3,5 раза – выживаемость гемопоэтических клоногенных клеток костного мозга. Применение ингибитора NOS на модели КРТП через 5 минут и 4 часа после КРТП повышало выживаемость животных до 90-100%, в отличие от контрольной группы (выживаемость составила 20%).

Ключевые слова: комбинированные радиационно-термические поражения, ингибиторы NOS, радиационная защита, выживаемость.

THE POSSIBILITY OF USING NOS INHIBITORS AS AGENTS OF PREVENTION AND THERAPY OF COMBINED RADIATION INJURIES

E.A. Chesnakova, M.V. Filimonova, V.M. Makarchuk, A.S. Samsonova, T.S. Korneeva, V.I. Surinova, L.I. Shevchenko, A.S. Filimonov, L.P. Ulianova

A. Tsyb MRRC – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail:

ches.ekaterina2010@yandex.ru

Summary. Research in models of acute total body irradiation and combined radiation-thermal injury (CRTI) showed high radioprotective efficiency of NOS inhibitors when used in low-toxic doses (LD₁₆ 1/8 LD₁₆). Injection of NOS inhibitors prior to radiation exposure increased to 60-75% the survival of animals and in 3-3.5 times – the survival of hemopoietic clonogenic cells of bone marrow. On the CRTI model we demonstrate that the use of NOS inhibitors after 5 minutes and 4 hours after the combined injury increased the survival of animals to 90-100%, whereas in the control group the survival rate was only 20%.

Key words: combined radiation-thermal injuries, NOS inhibitors, radiation protection, survival.

В настоящее время ионизирующее излучение является неотъемлемой частью жизнедеятельности человека. В связи с чем, существует риск возникновения радиационных аварий и катастроф, сопровождающихся взрывами, пожарами и выбросами радионуклидов. Анализ последствий таких событий, как атомная бомбардировка японских городов Хиросима и Нагасаки, аварии на атомных подводных лодках, на Чернобыльской и других АЭС, свидетельствуют, что в большинстве случаев у пострадавших возникали не изолированно-радиационные поражения (40-50%), а комбинированные (60-50%) (КРП) – сочетание общего облучения с механической и/или ожоговой травмой, а также с воздействием химических веществ [4,5]. Каждый из этих компонентов, в результате развития феномена взаимного отягощения, вносит

существенный вклад в патогенез острой лучевой болезни, что значительно отягощает состояние пострадавших и повышает вероятность летальных исходов. В этой связи схемы лечения таких многокомпонентных патологических состояний должны существенно отличаться от лечения изолированных лучевых повреждений, ожогов и травм. МРНЦ им. А.Ф. Цыба имеет обширный опыт исследований в области поиска средств терапии комбинированных радиационно-термических поражений (КРТП) [1-3,6]. Так, в последние годы нами получены собственные данные о высокой эффективности NOS-ингибиторов из класса N,S-замещённых производных изотиомочевина, как в качестве радиопротекторов, так и в качестве радиомитигаторов [7], что позволяет предполагать их высокую перспективность при лечении комбинированных радиационных, в частности радиационно-термических поражений.

Исследования радиозащитных свойств ингибиторов NOS проведены на самцах мышей F₁ (СВА×С₅₇ВL_{6j}) по 12 особей в группе. Мышей облучали вдозах 6 Гр и 10 Гр лучами ⁶⁰Со при мощности дозы 0,4 – 0,8 Гр/мин. При моделировании КРТП сразу после тотального облучения в дозе 7 Гр, животным наносили термический ожог III степени 10% общей площади поверхности тела с помощью мощной вспышки света. Животным опытных групп вводили ингибиторы NOS в дозе 1/8 ЛД₁₆. Эффективность ингибиторов NOS оценивали по критериям 30-суточной выживаемости животных и выживаемости гемопоэтических клоногенных клеток костного мозга методом селезёночных эндоклоний.

Результаты исследований радиозащитных свойств ингибиторов NOS показали высокую эффективность (выживаемость 60-75%) при их использовании в относительно малотоксичных дозах (1/8 ЛД₁₆). Кроме того, применение ингибиторов NOS до радиационного воздействия повышало в 3-3,5 раза выживаемость гемопоэтических клоногенных клеток костного мозга.

На модели КРТП показано, что применение ингибитора NOS через 5 минут и 4 часа после КРТП повышало выживаемость животных до 90-100%, тогда как в контроле выживаемость составляла лишь 20%. Применение ингибитора NOS после КРТП на 15-30% повышало выживаемость гемопоэтических клоногенных клеток костного мозга.

Данные исследования показали высокую перспективность ингибиторов NOS в качестве радиозащитных средств и средств лечения комбинированных радиационно-термических поражений.

Список литературы

1. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Влияние средств микробного происхождения на уровень цитокинов в сыворотке крови, гематологический статус и выживаемость мышей при комбинированных радиационных поражениях // Радиационная биология. Радиоэкология. №1, Т. 41. – 2001. – С. 38 – 42
2. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Изучение роли интерлейкина-6 (ИЛ-6) в патогенезе комбинированных радиационно-термических поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. – №4, Т.44. – 2004. – С. 398 – 402
3. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Эффекты модуляторов уровня цитокинов на выживаемость мышей и крыс при комбинированных радиационно-термических поражениях // Радиационная биология. Радиоэкология. №4, Т. 44. – 2004. – С. 392 – 397

4. Комбинированные радиационные поражения: патогенез, клиника, лечение / А.И. Бритун, Р.С. Будагов, Е.А. Вагнер и др.; под ред. А.Ф. Цыба, М.Н. Фаршатова. – М.: Медицина. – 1992. – 288 с.
5. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Бояринцев В.В. Комбинированные радиационные поражения и их компоненты. – СПб: Фолиант. – 2015. – 216 с.
6. Проскураков С.Я. и др. Оценка роли оксида азота в отягощении исходов комбинированных радиационно-термических поражениях / С.Я. Проскураков, Л.П. Ульянова, В.Г. Скворцов, Р.С. Будагов // Радиационная биология. Радиоэкология. №3, Т. 45. – 2005. – С. 316 – 319
7. Филимонова, М.В. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтазы T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами / М.В. Филимонова, Л.И. Шевченко, В.М. Макачук, Е.А. Чеснакова, О.С. Измestьева, Т.С. Корнеева Т.С., А.С. Филимонов // Радиационная биология. Радиоэкология – 2015. – Т. 55, № 3, С. 250–259

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ РАДИАЦИОННЫХ РИСКОВ

И.А. Чешик, А.Н. Никитин, Д.В. Сухарева

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь,
e-mail: nikitinale@gmail.com

Резюме. Наиболее опасные изотопы ядерных технологий - цезий – ^{134}Cs и ^{137}Cs . Проведена оценка возможности использования микробиологических добавок для коррекции скорости выведения его из организма. Лабораторные крысы получали загрязненные ^{137}Cs корма и микробиологические препараты. При хроническом пероральном поступлении ^{137}Cs эффективный период полувыведения радиоизотопа у животных составляет 352 ± 69 часов. Употребление препаратов EM 1 и EMX-Gold сокращает время полувыведения цезия на 16–19%.

Ключевые слова: цезий, период полувыведения, микробиологические пищевые добавки, молочнокислые бактерии, дрожжевые грибы.

THE USE OF EFFECTIVE MICROORGANISMS TO REDUCE RADIATION RISKS

I.A. Cheshyk, A.N. Nikitin, D.V. Sukhareva

Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel,
Republic of Belarus, *e-mail: nikitinale@gmail.com*

Summary. The most dangerous isotopes of nuclear technologies are cesium - ^{134}Cs and ^{137}Cs . It was made an assessment of the possibility of using microbiological additives to correct the rate of its removal from the body. Lab rats received feed contaminated with ^{137}Cs and microbiological preparations. The effective half-life of the radioisotope in animals is 352 ± 69 hours in chronic oral intake of ^{137}Cs . The introduction of microbiological preparations EM-1 and EMX-Gold into the diet for two months reduces the half-life of cesium by 16–19%.

Key words: cesium, half-life, microbiological nutritional supplements, lactic acid bacteria, yeast fungi.

Необходимость решения задачи обеспечения радиационной и экологической безопасности человека и объектов биоты обусловливается развитием ядерных технологий. Для них характерно образование и накопление искусственных радионуклидов, способных при определенных обстоятельствах поступать в окружающую среду.

Вычлениют две компоненты выделения цезия из организма – быструю, составляющую около 10% запаса радионуклида (период полувыведения – около суток), и медленную (50–200 суток). Исследователи отмечают существенную вариабельность в скорости выведения: она зависит от физиологического состояния, возраста, режима питания и питья, обеспеченности калием. Международная комиссия по радиологической защите рекомендует считать биологический период полувыведения цезия из организма взрослого человека равным 70 суткам. Сходные возрастные закономерности установлены и у лабораторных животных. Период эффективного полувыведения быстрой компоненты у крысят – около 2 суток (58%), у взрослых особей – 8 (56%). Для медленной компоненты аналогичные показатели равны 36 (42%) и 37 (44%) суткам. Биологический период полувыведения накопленного ^{137}Cs для собак принят за 40 суток, для крыс – 18, мышей – 3 суток [1].

Целью данного исследования являлся анализ влияния препаратов, основанных на использовании культур живых микроорганизмов или культуральных сред на биокинетические параметры ^{137}Cs в организме белых крыс.

В экспериментах на животных показано, что введение ^{137}Cs в дозе 1,48 МБк/г порождает острую форму лучевой болезни. Уменьшение вводимой активности вдвое влечет сокращение продолжительности жизни, снижение количества лимфоцитов и нейтрофилов, развитие лейкопении и анемии. У людей острые биологические эффекты наблюдаются при попадании в организм порядка 1 ГБк ^{137}Cs . Это сопоставимо с дозой внешнего облучения 4–6 Гр. Максимальная доза, при которой еще не обнаруживается биологический эффект инкорпорации ^{137}Cs , для человека ниже в 5 раз, чем для собаки, и в 35– чем для крысы. При однократном поступлении ^{137}Cs безопасной для людей считается доза 2,0 МБк на 1 кг массы тела [2].

К настоящему времени разработаны и нашли практическое применение сорбенты, предназначенные для ускорения выведения из организма цезия и других радионуклидов в случае возникновения аварийной ситуации, когда изотоп проникает в ткани через органы дыхания или перорально, что нецелесообразно в условиях хронического облучения при проживании на загрязненных территориях. Поэтому наряду с разработкой системы мер по снижению поступления техногенных радионуклидов в организм человека с продуктами питания уместен поиск пищевых добавок, способствующих более быстрому их удалению. Один из факторов, влияющих на показатели усвоения цезия и выведения его из организма, – микрофлора кишечника. Она оказывает существенное влияние на сорбцию минеральных элементов питания. Деятельность микроорганизмов и их биологически активные соединения могут изменять активность мембранных насосов или проницаемость клеточных мембран. Кроме того, бактерии снижают доступность отдельных химических элементов для всасывания, переводя их в слаборастворимые формы или сорбируя на собственной поверхности. Высокая поглощательная способность в отношении цезия обнаружена у водорослей, грибов, дрожжей и цианобактерий [3]. Однако видовые особенности бактерий в плане накопления Cs изучены недостаточно хорошо.

Использование микробиологических добавок для коррекции биокинетических параметров цезия в организме млекопитающих практически не исследовано и представляет определенный интерес анализ воздействия препаратов, основанных на культурах живых микроорганизмов или культуральных средах. Соответствующий эксперимент был поставлен на белых лабораторных крысах – самцах стадного разведения в условиях вивария. Животные получали корма, включающие ^{137}Cs (с перерывами для оценки скорости выведения радиоизотопа) и микробиологические препараты. Содержание радиоцезия в рационе составляло $34,95 \pm 5,62$ Бк/сут. Прижизненные измерения удельной активности ^{137}Cs в организме подопытных проводились два раза – после двухмесячного приема загрязненного корма и спустя 8 суток усвоения условно чистого питания. Для этого животные помещались в специальный контейнер, геометрия которого учитывалась при расчете удельной активности радионуклида.

Для коррекции биокинетических параметров ^{137}Cs в организме лабораторных крыс использовали микробиологические препараты EM 1 и EMX-Gold, предоставленные компанией-производителем EMRO (Япония). EM 1 – симбиотический комплекс культивируемых непатогенных микроорганизмов, выделенных из природных объектов: молочнокислых и пурпурных фотосинтезирующих бактерий, дрожжевых грибов. EMX-Gold – биологически активная добавка на основе экстракта из EM 1; представляет собой набор вторичных метаболитов, полученных из симбиотической культуры микроорганизмов. Среди метаболитов присутствуют вещества с выраженной

противовоспалительной и антиоксидантной активностью. Аккумуляция радионуклидов в организме млекопитающих определяется такими факторами, как величина их поступления с кормом и водой, абсорбция в желудочно-кишечном тракте, перераспределение в органах и тканях, биологическое выведение с продуктами жизнедеятельности.

Удельную активность ^{137}Cs в организме крыс оценили в каждой группе животных после 60 суток приема загрязненного корма, а затем – через 8 суток после нахождения на условно чистом рационе. В момент равновесия средняя активность радиоизотопа в их теле достигла 210–230 Бк/кг. В последующие 8 суток выведено 36–39% накопленного ^{137}Cs . Анализ данных показал, что у животных, получавших в качестве добавки препарат EMX-Gold, удельная активность ^{137}Cs несколько ниже, однако это уменьшение статистически недостоверно. В этой же группе наблюдается тенденция к снижению данной величины относительно группы, принимавшей EM 1 как добавку, и контроля после 8-суточной отмены «грязного» корма с заменой его на аналогичный условно чистый.

Повторное измерение активности ^{137}Cs у животных через заданный промежуток времени после перевода на условно чистый рацион позволило рассчитать видимый эффективный период полувыведения радионуклида. У особей, получавших микробиологические препараты, такой временной отрезок оказался на 16–19% короче по сравнению с контролем. Наименьший период полувыведения – в группе ^{137}Cs + EMX-Gold: 282 ± 59 часов. Однако биокинетика цезия даже для сравнительно однородной когорты животных имеет высокую степень вариабельности, из-за чего гипотеза о положительном влиянии препаратов EM 1 и EMX-Gold на ускорение выведения радионуклида подтверждена в данном эксперименте лишь на уровне значимости 0,15.

Результаты опытов показывают, что при двухмесячном приеме микробиологических препаратов EMX-Gold и EM 1 вместе с загрязненным кормом наблюдается тенденция к ускорению выведения радионуклида из организма. Это свидетельствует о перспективности дальнейших поисков в данном направлении. Среди возможных механизмов обнаруженного явления следует указать на сорбцию ^{137}Cs клеточными стенками микроорганизмов, а также на изменение минерального обмена, вызванное воздействием накопленных в среде культивирования биохимических продуктов жизнедеятельности бактерий и грибов, входящих в состав препарата.

Таким образом, в условиях хронического перорального поступления ^{137}Cs эффективный период полувыведения радиоизотопа из организма 8-месячных самцов крыс, содержащихся на стандартном рационе, – 352 ± 69 часов. Введение в пищу животных на протяжении двух месяцев микробиологических препаратов EM 1 и EMX-Gold сокращает период полувыведения цезия на 16–19%, однако различия с контролем достоверны только на уровне значимости 0,15.

Список литературы

1. Калистратова В.С. Радиобиология инкорпорированных радионуклидов. / И.К. Беляев, Е.С. Жорова, П.Г. Нисимов, И.М. Парфенова, Г.С. Тищенко // Под ред. В.С. Калистратовой. Издательство ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2012 – 464 с.
2. Булдаков Л.А. Радиоактивные вещества и человек / Москва: Энергоатомиздат, 1990. – 158 с.
3. Avery S.V. Caesium transport in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: kinetics and evidence for uptake via ammonium transport system(s) / S.V. Avery, G.A. Codd, G.M. Gadd // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 95. P. 253–258.

РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА РЕКСОД®

И.В. Чурилова¹, О.В. Терехов², В.В. Пасов², Н.В. Леонова¹, Ю.И. Дроздова¹, Д.А. Егорова¹

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, ²ООО «Центр Реабилитации», г. Обнинск, Россия, e-mail: churilova@hpb-spb.com

Резюме. Применение препарата Рексод® во время проведения лучевой терапии приводит к снижению числа ранних лучевых реакций более чем у 73 % больных с различными формами злокачественных заболеваний. Применение препарата Рексод® в лечении поздних лучевых повреждений кожи способствует регрессии фибросклеротических изменений.

Ключевые слова: радиационные поражения, радиопротекция, препараты супероксиддисмутазы, поздние лучевые фиброзы.

RECSOD®'S RADIOPROTECTIVE PROPERTIES

I.V. Churilova¹, O.V. Terekhov², V.V. Pasov², N.V. Leonova¹, I.I. Drozdova¹, D.A. Egorova¹.

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, ²Rehabilitation Center LTD", Obninsk, Russia, e-mail: churilova@hpb-spb.com

Abstract. Recsod®'s usage during radiotherapy reduces the number of early reactions to radiation in more than 73% of patients with various forms of malignant diseases. The use of Recsod® for treatment of late radiation skin damage contributes to the regression of fibrosclerotic changes.

Key words: radiation damage, radioprotection, superoxide dismutase, late radiation fibrosis

Для развития системы медицинской противорадиационной защиты актуально создание новых лекарственных препаратов, действующих на ключевые звенья патогенеза лучевых поражений. К числу наиболее перспективных лекарственных средств относятся ферментные антиоксидантные (АО) препараты.

Цель исследования: оценка радиопротекторных свойств нового отечественного ферментного препарата Рексод® на экспериментальной модели радиационных поражений и в профилактике развития лучевых реакций и поздних лучевых повреждений у больных во время и после проведения лучевой терапии.

Предпосылкой для использования препаратов супероксиддисмутазы (СОД) в радиобиологии явились данные иммунохимических исследований, из которых следует, что степень радиорезистентности органов тесно связана с содержанием в них СОД. Уже на начальном этапе повреждения клеток под действием радиации наблюдается явление ацидоза, приводящее к снижению активности основных АО ферментов, наряду с избыточной генерацией активных форм кислорода. Рядом исследователей установлено, что при облучении даже очень высокими дозами γ -лучей в присутствии СОД, в среде резко снижается количество морфологически измененных клеток и увеличивается их выживаемость. По мнению ряда исследователей, радиозащитный эффект СОД связан с предотвращением повреждений сульфгидрильных групп и липидных структур биомембран и замедлением развития цепных реакций. Первым радиопротекторным препаратом на основе Cu-Zn-СОД из печени крупного рогатого скота, зарегистрирован препарат Пероксинорм (Германия). Препарат достаточно широко использовался для уменьшения нежелательных последствий радиотерапии при

злокачественных новообразованиях у больных с опухолями мочевого пузыря в 80-90 гг [1,2].

Проведена оценка радиозащитных свойств препарата Рексод[®], 3,2 млн ЕД (8 мг) лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (ЛСР-007164/09-100909), производства ФГУП «Гос НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург. Основным действующим веществом препарата Рексод[®] является рекомбинантная супероксиддисмутаза человека.

Радиобиологические эксперименты, проведены на двух видах лабораторных животных, получавших воздействие ионизирующей радиации в 2-х дозовых диапазонах (средне- и абсолютно летальные дозы). Определялись следующие интегральные характеристики: выживаемость, средняя продолжительность жизни погибших животных, основные показатели состояния периферической крови и костного мозга. Доза введения препарата за 1 час до облучения - 0,195 мг/кг, доза введения препарата за 1 час после облучения - 0,065 мг/кг, внутривенно. Наиболее эффективной во всех дозовых диапазонах оказалась схема двойного введения препарата – за 1 час до и через 1 час после облучения. Введение препарата приводило к достоверному повышению количества эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови по сравнению с облученным контролем. Полученные факты дали основание полагать, что радиозащитное действие препарата Рексод[®] реализуется при модификации основных синдромов лучевой болезни – кишечного и костномозгового [3].

Суммируя данные лабораторных исследований, следует отметить, что препарат Рексод[®] соответствует требованиям, предъявляемым к радиопрофилактическим и радиотерапевтическим препаратам. Относительно невысокие эффективные дозы, длительность действия, отсутствие токсичности и побочных эффектов, выраженные гемостимулирующие свойства делают новый препарат Рексод[®] реальным кандидатом для включения в схемы сопроводительной терапии при облучении онкологических больных.

Препарат Рексод[®] применяли для профилактики развития лучевых реакций и поздних лучевых повреждений у больных во время, и после проведения лучевой терапии в отделениях хирургического и консервативного лечения лучевых повреждений МРНЦ РАМН. Общее количество больных вошедших в исследование составило 55 человек со злокачественными заболеваниями различных областей (рак тела и шейки матки, рак вульвы, рак мочевого пузыря и предстательной железы, рак молочной железы, центральный и периферический рак лёгкого, саркома мягких тканей, опухоли головы и шеи). Способ и дозы введения препарата: ежедневно внутривенно в дозе 16 мг (1 группа), или в дозе 32 мг (2 группа). Рексод[®] использовали в последние пять дней проведения лучевой терапии, либо в любой период проведения лучевой терапии при появлении первых признаков лучевых реакций. Показано, что препарат Рексод[®] имеет хорошую переносимость, обладает значительной антиоксидантной активностью, его применение приводит к снижению числа ранних лучевых реакций более чем у 73 % больных во время проведения лучевой терапии. Оптимальной следует считать разовую дозу 32 мг. Препарат Рексод[®] был использован в лечении поздних лучевых повреждений кожи [4,5]. Группа включала в себя 60 человек с лучевыми фиброзами кожи и подкожной клетчатки различной локализации. Доза введения - 32 и 64 мг, количество обкалываний – 6-10, в зависимости от площади поражения, ежедневно, внутривенно-подкожно по условному циферблату. Отмечена хорошая переносимость препарата, без осложнений. В результате, у 90 % пациентов площадь поражения сократилась в 2 раза, у 10% - на 30 %. Таким образом, доказана эффективность лечения поздних лучевых фиброзов кожи и подкожной клетчатки с

помощью препарата Рексод®.

Конкурентными преимуществами препарата Рексод® является то, что он не снижает основной цитолитический и цитостатический эффект от ионизирующего излучения и не воздействует на основной противоопухолевый эффект лучевой терапии. Возможна разработка новых форм введения препаратов на основе рекомбинантной супероксиддисмутазы и внедрение их в клиническую практику для профилактики и лечения лучевых повреждений различных органов. Это существенно повысит эффективность лечения онкологических заболеваний, сопровождающихся интенсивными курсами химиотерапии и радиотерапии, а также приведет к снижению сроков пребывания пациентов в стационаре.

Список литературы

1. Petkau, A., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Meeker, B.E., Brady, C.M. Radioprotection of mice by superoxide dismutase // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1975. Vol. 65. P. 886-893.

2. Marberger, H., Huber, W., Menander-Huber, K.B., Bartsch, G. Orgotein: A new drug for the treatment of radiation cystitis // *Europ. J. Rheumatol. Inflamm.*, 1981. Vol. 4. P. 244-249

3. Стефанов А.В., Деримедведь Л.В., Чурилова И. В. [и др.] Клинико-экспериментальное обоснование применения супероксиддисмутазы в медицине / X: Изд-во НфаУ; Золотые страницы 2004. -288с.

4. Пасов В.В., Белая Н.С., Терехов О.В. Рексод в реабилитации больных лучевыми повреждениями кожи и подкожно-жировой клетчатки. Материалы VII съезда онкологов России. Москва, 2009, Том II, С. 228-229.

5. Пасов В.В., Терехов О.В., Постнов Ю.Г. и др. Новые подходы в консервативном лечении глубоких поздних лучевых повреждений мягких тканей// *Радиация и риск*, 2010. Том 19. №2. С. 58-64.

АНТИГЕЛЬМИНТНЫЙ ПРЕПАРАТ НИКЛОЗАМИД, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОР ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

В.Г. Шуватова, А.П. Кувырченкова, Ю.П. Семочкина, Е.Ю. Москалёва

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия,

e-mail: shuvatova.vg@gmail.com

Резюме. Изучены молекулярные механизмы радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении опухолевых стволовых клеток (ОСК) аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. Показано, что радиосенсибилизирующий эффект никлозамида связан с его способностью ингибировать сигнальный каскад WNT, специфичный для ОСК, а также уменьшать скорость репарации двунитевых разрывов ДНК при совместном действии с γ -излучением.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, аденокарцинома молочной железы человека линии MCF-7, γ -излучение, никлозамид, сигнальный путь WNT, радиосенсибилизация.

ANTHELMINTIC DRUG NICLOSAMIDE AS A PERSPECTIVE RADIOSENSITIZER OF CANCER STEM CELLS. POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION

V.G. Shuvatova, A.P. Kuvyrchenkova, Yu.P. Semochkina, E. Yu. Moskaleva

NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia.

e-mail: shuvatova.vg@gmail.com

Summary. Molecular mechanisms of the radiosensitizing effect of niclosamide on cancer stem cells (CSC) of the human mammary adenocarcinoma MCF-7 cell line were studied. It was shown that the radiosensitizing effect of niclosamide is associated with its ability to inhibit WNT signaling cascade that is specific to the CSC, as well as to reduce the rate of DNA double-strand breaks reparation when combined with γ -radiation.

Key words: cancer stem cells, human breast adenocarcinoma cell line MCF-7, γ -radiation, niclosamide, WNT signaling pathway, radiosensitization.

Практически во всех типах злокачественных опухолей обнаружена малочисленная субпопуляция опухолевых стволовых клеток (ОСК), которая играет основополагающую роль в развитии опухолевого процесса и метастазировании [1]. ОСК обладают повышенной активностью систем репарации ДНК по сравнению с основной массой опухолевых клеток и характеризуются более высокой устойчивостью к действию ионизирующего излучения [2]. Кроме того, вклад в радиорезистентность ОСК вносят высокие уровни специфичных для них антиапоптотических белков. В ОСК активны сигнальные пути WNT, Notch, и Hedgehog, которые регулируют их пролиферацию и дифференцировку. Активация этих сигнальных путей может приводить к ускоренной репопуляции ОСК во время или после лучевой терапии [3]. В настоящее время ведется активный поиск препаратов, способных повышать радиочувствительность ОСК. Согласно последним данным одним из таких препаратов может являться хорошо известный и давно используемый в практике противогельминтный препарат никлозамид. В скрининговом исследовании большого количества соединений обнаружена радиосенсибилизирующая активность никлозамида

в отношении ОСК рака молочной железы линий MCF7 и MDA-MB-231 [4]. При изучении механизмов действия никлозамида было показано, что он ингибирует сигнальный каскад WNT и пролиферацию клеток лейомиомы [5], а также снижает мембранный потенциал митохондрий и индуцирует образование активных форм кислорода [6].

Целью работы являлось изучение молекулярных механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Обогащенную ОСК культуру маммосфер получали при культивировании клеток линии MCF-7 в низкоадгезивных условиях в среде DMEM/F12 без фенолового красного, содержащей EGF 20нг/мл, bFGF 10 нг/мл, B27 2%, гепарин 4 мкг/мл, инсулин 10 мкг/мл. Клетки облучали в среде без факторов через 1 час после добавления 2 мкМ никлозамида в дозах 2 или 4 Гр на установке ГУТ-200М (источник γ -излучения ^{60}Co , мощность дозы 0,54 Гр/мин). Через 24 ч после облучения среду, содержащую никлозамид, заменяли на среду без препарата. Через 7 суток после облучения при помощи светового микроскопа подсчитывали количество маммосфер, образованных клетками, культивируемыми в концентрации 1 клетка в мкл. Активность WNT системы исследовали через 24 ч после облучения с помощью проточной цитометрии с использованием антител к β -катенину и белку Dishevelled (Dvl-2). Количество двунитевых разрывов (ДР) ДНК через 24 часа после облучения определяли по уровню гистона γ -H2AX с помощью проточной цитометрии.

Количество маммосфер через 7 суток после инкубации с никлозамидом без облучения и после облучения в дозах 2 и 4 Гр составило $91\pm 3\%$, $90\pm 5\%$ и $60\pm 3\%$, а после инкубации с никлозамидом и облучении – $67\pm 4\%$ и $55\pm 2\%$ соответственно относительно контроля, не подвергавшегося действию облучения и никлозамида. Таким образом, облучение клеток в дозе 2 Гр, принятой для однократного облучения при лучевой терапии, приводило лишь к незначительному снижению количества ОСК, что соответствует данным о высокой радиорезистентности ОСК. При этом через 7 сут после совместного действия никлозамида и облучения в дозах 2 и 4 Гр количество маммосфер статистически значимо снижалось на 23 и 5% по сравнению с их количеством после облучения в соответствующих дозах без добавления никлозамида. Эти результаты свидетельствуют о том, что никлозамид в субтоксичной концентрации повышает чувствительность ОСК к действию γ -излучения.

Обнаружено, что никлозамид снижает количество β -катенина на 11% и повышает количество Dvl-2 на 16% относительно контроля. Облучение приводило к увеличению количества белков сигнальной системы WNT: уровень β -катенина возрастал на 8%, а Dvl-2 – на 38% относительно контроля. При совместном действии никлозамида и облучения количество β -катенина и Dvl-2 уменьшалось на 23% и 30% по сравнению с действием только облучения, что свидетельствует об ингибировании системы WNT в ОСК линии MCF-7 в этих условиях.

Ранее нами было показано, что никлозамид повышает уровень индуцируемых γ -излучением ДР ДНК, которые оценивали через 1 ч после облучения по уровню гистона γ H2AX, до более высоких значений, чем при раздельном использовании каждого из этих факторов [7]. Поэтому в настоящей работе было исследовано влияние совместного действия никлозамида и облучения на уровень ДР ДНК через 24 ч после облучения в дозах 2 и 4 Гр. Показано, что через 24 часа после облучения в дозах 2 и 4 Гр уровень гистона γ -H2AX был выше контрольного уровня на 10% и 30%, а при совместном действии никлозамида и облучения – на 30% и 60% соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что никлозамид ингибирует скорость репарации ДР ДНК в ОСК линии MCF-7.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что механизмы радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении ОСК линии MCF-7 связаны с его способностью ингибировать сигнальный каскад Wnt, регулирующий пролиферацию и дифференцировку ОСК, а также с ингибированием скорости репарации ДР ДНК при совместном действии с γ -излучением.

Список литературы

1. Li F., Tiede B., Massagué J. et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Research*. 2007. Vol. 17. P. 3–14.
2. Krause M., Dubrovskaya A., Linge A. et al. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. Vol. 109. P. 63–73.
3. Krause M., Dubrovskaya A., Linge A. et al. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. Vol. 109. P. 63–73.
4. Wang Y.C., Chao T.K., Chang C.C. et al. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells // *PLoS One*. 2013. № 8. e74538.
5. Ono M., Yin P., Navarro A., et al. Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth // *Fertil Steril*. 2014, Vol. 101, № 5. P. 1441-1449.
6. Khanim F.L., Merrick B.A., Giles H.V. et al. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production // *Blood Cancer J*. 2011. Vol. 1, № 10. e39.
7. В.Г. Шуватова, А.П. Кувырченкова, Ю.П. Сёмочкина, Е.Ю. Москалёва. Радиосенсибилизация опухолевых стволовых клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 с помощью никлозамида // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2017. Том 62, № 6. С. 5-11.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РНК КАК БИОМАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ РАДИОЗАЩИТНЫХ СРЕДСТВ

*Л.В.Шуленина¹, В.Ф.Михайлов¹, Д.В.Салеева¹, Н.Ф.Раева¹,
М.В.Незнанова¹, Г.Д.Засухина²*

¹ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И.Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Россия

e-mail: shulenina2010@mail.ru

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия

Резюме. Изучение комплекса РНК-показателей, состоящих из мРНК транскрипционных факторов и онкогенов, микроРНК и длинных некодирующих РНК, может быть полезно для характеристики радиорезистентности клеток, возникающей после действия радиозащитных средств. Показано, что введение тимохинона (8,0 мкг/мл) после рентгеновского облучения в дозе 10 Гр снижало гибель дефектных по р53 опухолевых клеток линии Jurkat, вызывая значительные изменения экспрессии онкогенов и супрессоров опухолей, а также длинных некодирующих РНК и микроРНК.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, микроРНК, длинные некодирующие РНК, тимохинон (ТХ)

PROSPECTS OF VARIOUS RNA-BASED MOLECULES AS BIOMARKERS IN THE ESTIMATION OF RADIOPROTECTIVE COUNTERMEASURES EFFICIENCY

*L. V.Shulenina¹, V.F.Mikhailov¹, D.V.Saleeva¹, N.F.Raeva¹, M.
V.Neznanova¹, G. D. Zasukhina²*

¹ State Research Center –Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

²N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Summary. The study of a complex of RNA-indicators consisting of mRNA transcription factors and oncogenes, microRNAs and long noncoding RNAs, can be useful for characterizing the cell radioresistance arising after the action of radioprotective agents. It was shown that administration of thymoquinone (8 µg/ml) after exposure to 10 Gy X-ray radiation reduced the death of p53 defective tumor Jurkat cells, causing significant changes in the expression of tumor oncogenes and suppressors, as well as long noncoding RNAs and microRNAs.

Key words: ionizing radiation, microRNA, long noncoding RNA, thymoquinone (TQ)

Ионизирующая радиация вызывает глобальное изменение экспрессии генов в клетках млекопитающих и человека, приводя к перестройке функционирования сигнальных сетей и способствуя адаптации к изменившимся условиям существования. Регуляторные РНК (микроРНК и длинные некодирующие РНК/днРНК) являются модуляторами экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровне и принимают активное участие в ответе клеток на стресс-воздействия. Показано, что микроРНК в плазме крови могут быть полезны для биодозиметрии в диапазоне доз от 0,1 Гр до 12 Гр [1,2]. По сравнению с белковыми биомаркерами РНК обладают рядом

преимуществ, связанных с большей чувствительностью (метод ПЦР позволяет амплифицировать следовые последовательности РНК), с низкой стоимостью (для обнаружения белка требуется специфическое дорогостоящее антитело), с высокой стабильностью молекул в плазме и сыворотке крови (например, кольцевые РНК). Многие регуляторные РНК являются мишенями транскрипционного фактора p53, либо сами воздействуют на мРНК этого гена [3,4]. Показано, что исследование регуляторных РНК в сыворотке крови облученных животных имеет прогностическое значение даже в большей степени, чем дозиметрическое [5]. Потенциально возможно применение этих показателей для индивидуального прогноза последствий воздействия радиации и эффективности защитных средств. Тимохинон (ТХ), выделенный из *Nigella sativa*, является антиоксидантным, противовоспалительным, противомикробным и противоопухолевым средством, способным защитить иммунную систему и снизить гибель Т-клеток при воздействии ионизирующей радиации [6]. Целью нашей работы было исследование мРНК онкосупрессоров и регуляторных РНК в облученных клетках линии Jurkat после введения ТХ.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии Jurkat (концентрация 3×10^5 в 1 мл среды с 10% эмбриональной телячьей сывороткой), которые были поделены на несколько групп: интактная культура клеток, культура клеток с добавлением тимохинона, культура клеток облученная, и культура клеток, облученная с добавлением тимохинона. Тимохинон вносили в культуру в дозе 8,0 мкг/мл среды через 1 ч облучения. Облучение клеток осуществлялось на Рентгеновской Установке Биологической РУСТ-М1 (РУБ РУСТ-М1) в дозе 10 Гр. Анализ относительного содержания мРНК генов, длинных некодирующих РНК, а также зрелых микроРНК в культуре проводили методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Установлено, что введение ТХ облученным клеткам линии Jurkat снижало их гибель. В наших экспериментах через 20 ч после воздействия ионизирующей радиации в дозе 10 Гр погибало 88% клеток, а после введения ТХ в дозе 8,0 мкг/мл гибли только 64% клеток ($p < 0,05$). Приведенные нами ниже данные по экспрессии всех РНК показателей представлены для срока 20 ч после облучения. Известно, что при воздействии ионизирующей радиации в клетках активируется онкосупрессор p53, что приводит к стимуляции p53-зависимых генов и увеличению стабильности генома. В онкотрансформированных клетках происходит инактивация этой системы часто из-за возникающих структурных нарушений гена p53. В клетках линии Jurkat, мутации в гене p53 наблюдаются в 71% случаев [7]. Радиационное воздействие в дозе 10 Гр не приводило к изменению содержания мРНК гена p53. Известно, что мутированный p53 синтезирует белок, способный выполнять онкогенные функции. При добавлении ТХ после облучения наблюдали статистически значимое снижение содержания обладающей малым временем жизни мРНК гена p53.

Уровень мРНК другого онкосупрессора *PTEN* изменялся только после радиационного воздействия. Содержание мРНК гена *Sp1* после добавления ТХ достоверно увеличивалось по сравнению с контролем, как в необлученных, так и в облученных клетках ($p < 0,05$). Белок этого гена представляет собой транскрипционный фактор цинкового пальца, который связывается с богатыми GC-мотивами многих промоторов. Он участвует в различных клеточных процессах, включая дифференцировку, рост, апоптоз, иммунные ответы, ответ на повреждение ДНК и ремоделирование хроматина. Ни радиация, ни ТХ не

оказывали воздействия на днРНК RoR и днРНК Gas5, которая способна модулировать прохождение клеточного цикла и апоптозы, а также онкогенов днРНК HOTAIR и MALAT1. Через 20 ч после добавления к контрольным клеткам ТХ наблюдали увеличение содержания онкогена NEAT1 ($p < 0.05$), в то время как в облученных клетках после добавления ТХ такого изменения не выявлялось. Среди исследованных микроРНК следует отметить miR-181a и снижение его уровня после облучения и введения ТХ, что, возможно, обеспечивает в Т-лимфобластных клетках уменьшение восприимчивости к антигенам. Также наблюдалось снижение экспрессии miR-107 в клетках как после радиационного воздействия в дозе 10 Гр, так и при облучении и действии ТХ.

Выводы. Представленные результаты исследований демонстрируют, что:

- для характеристики фенотипа клеток необходим комплекс РНК-показателей, состоящих из мРНК транскрипционных факторов и онкогенов, микроРНК и днРНК;

- введение ТХ может способствовать снижению пострадиационной гибели клеток, дефектных по p53, вызывая значительные изменения экспрессии онкогенов и супрессоров опухолей, а также регуляторных РНК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-03-00013 А).

Список литературы

1. Jacob N.K., Cooley J.V., Yee T.N., Jacob J, Alder H, Wickramasinghe P., Maclean K.H., Chakravarti A. Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry // PLoS One. 2013. Vol.8. №2. e57603.
2. Maes O.C., An J., Sarojini H., Wu H., and Wang E. Changes in microRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation // J Cell Biochem. 2008. Vol.105. P.824–834.
3. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Ледин Е.В. и др. Оценка эффективности P53-зависимой системы сохранения стабильности генома по содержанию микроРНК и мРНК в крови онкологических больных // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2015. Т.60. №1. С.5-14.
4. Sahu A., Sighal U., Chinnaiyan A. Long non-coding RNAs in cancer: from function to translation // Trends Cancer. 2015. Vol.1. P. 93—109.
5. Acharya S. S., Fendler W., Watson J., Hamilton A., Pan Y., Gaudio E., Moskwa P., Bhanja P., Saha S., Guha C., Parmar K., Chowdhury D.. Serum microRNAs are early indicators of survival after radiation-induced hematopoietic injury // Science Translational Medicine. 2015. Vol.7. Vol.287. P.287. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa6593
6. Guidaa M.S., Abd El-Aalb A., Kafafyc Y., Salamac S.F., Badr B.M., Badr G. Thymoquinone Rescues T. Lymphocytes from Gamma Irradiation-Induced Apoptosis and Exhaustion by Modulating Pro-Inflammatory Cytokine Levels and PD-1, Bax, and Bcl-2 Signaling // Cell Physiol Biochem 2016. Vol.38. P.786-800.
7. Gioia L., Siddique A., Head S. R, Salomon. D. R., Su A. I. A Genome-wide Survey of Mutations in the Jurkat Cell Line // bioRxiv preprint first posted online Mar. 18, 2017. doi.org/10.1101/118117.

**ИЗМЕНЕНИЕ В СОСТАВЕ БИСРЕТИНОИДОВ В СЕТЧАТКЕ И
РЕТИНАЛЬНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ ГЛАЗА МЫШИ ПРИ
ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

*Яковлева М.А.¹, Фельдман Т.Б.^{1,2}, Ляхова К.Н.³, Утина Д.М.³, Виноградова Ю.В.³,
Колесникова И.А.³, Островский М.А.^{1,2,3}*

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, Россия,

e-mail: lina.invers@gmail.com;

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия;

³Лаборатория радиационной биологии Объединенного Института Ядерных
Исследований, г. Дубна, Московская обл., Россия,

Резюме. Был проведен флуоресцентный и хроматографический анализ бисретиноидов из сетчатки и ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаз мышей до и после воздействия на них гамма-излучением и ускоренными протонами. Показано, что в результате тотального воздействия на мышью ионизирующего излучения дозой 1-4 Гр происходит сдвиг в коротковолновую область максимума флуоресценции хлороформного экстракта как из РПЭ, так и из сетчаток. Хроматографический анализ показал изменение относительного содержания отдельных бисретиноидов из РПЭ и сетчаток глаз мышей. Предполагается, что воздействие ионизирующего излучения на ткани глаза приводит к окислению бисретиноидов.

Ключевые слова: Ионизирующее излучение, глаз, сетчатка, ретинальный пигментный эпителий, бисретиноиды

**CHANGES IN THE BISRETINOID COMPOSITION IN THE RETINA AND
RENINAL PIGMENT EPITHELIUM FROM THE MOUSE EYE UNDER THE
ACTION OF IONIZING RADIATION**

*Yakovleva M.A.¹, T.B. Feldman^{1,2}, Lyakhova K.N.³, Utina D.M.³, Vinogradova U.V.³,
Kolesnikova I.A.³, M.A. Ostrovsky^{1,2,3}*

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: lina.invers@gmail.com

²Department of Molecular Physiology, Biological Faculty Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

³Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow
region, Russia

Summary. Fluorescence and chromatographic analysis of bisretinoids from RPE and retina of mice eye was carried out before and after gamma radiation and accelerated protons were exposed to them. It is shown that the effect of ionizing radiation by a dose of 1-4 Gy leads to a shift in the shortwave region of the fluorescence maximum of the chloroform extract for both RPE and retinas from the eyes of mice. HPLC analysis showed a change in the relative content of individual bisretinoids of lipofuscin granules from RPE and the retina of mice eye. It is assumed that the effect of ionizing radiation on the eye tissues leads to the oxidation of bisretinoids.

Key words: ionizing radiation, eye, retina, retinal pigment epithelium, bisretinoids

Известно, что при воздействии света происходит фотоокисление бисретиноидов липофусциновых гранул (пигмента «старости») (ЛГ), накапливающихся в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека и животных. При

этом происходит образование активных форм кислорода [1] и токсичных продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [2], что усугубляет развитие дегенеративных процессов в сетчатке и РПЭ. Показано также, что при воздействии различных видов ионизирующего излучения в клетке развивается окислительный стресс, приводящий к образованию активных форм кислорода, что может привести к гибели клетки [3]. Таким образом, можно прогнозировать, что воздействие ионизирующего излучения на ткани глаза может инициировать процесс окисления бисретиноидов в отсутствие света. В такой ситуации окисленные бисретиноиды в ЛГ, которые являются сильными флуорофорами, спектр испускания которых отличается от неокисленные бисретиноидов, могут стать универсальными маркерами оксидативного стресса в организме, подвергающегося воздействию ионизирующего облучения. Целью данной работы было проведение флуоресцентного и хроматографического анализа бисретиноидов, выделенных из клеток РПЭ и сетчатки глаза мыши до и после воздействия на них ионизирующего излучения.

Материалы и методы.

Для эксперимента использовали самцов мышей, гибриды первого поколения от скрещивания C57BL и CBA. Возраст 6 месяцев. Средняя масса 31 г. Мыши были облучены ускоренными протонами в пике Брэгга, а также тотально гамма-излучением ^{60}Co в дозах 1,2,3 и 4 Гр. Через сутки после облучения был произведен забой животных методом цервикальной дислокации, с последующим изъятием глаз, из которых затем извлекали отдельно сетчатку и РПЭ. Экстракт флуорофоров из сетчатки и клеток РПЭ получали по методу Фолча смесью хлороформ–метанол (1:1) [3]. Спектры флуоресценции суспензии РПЭ регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC (“Shimadzu”, Япония). Анализ флуорофоров (бисретиноидов) в хлороформных экстрактах из сетчаток и РПЭ глаз мышей проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «Knauer» (Германия) с колонкой «Диасфер 120 C18» (4*250 мм, размер сорбента 5 мкм). Разделение проводили путем линейного градиентного элюирования [1]. В качестве контроля использовали А2Е, синтезированный согласно методу, описанному в работе [4]. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» Советом международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1995 г.

Результаты и их обсуждение

После тотального облучения мышей гамма-излучением или ускоренными протонами на следующий день были получены хлороформные экстракты РПЭ и сетчаток из глаз мышей. Были зарегистрированы спектры их флуоресценции, а также проведен ВЭЖХ анализ. Показано, что при воздействии ионизирующего излучения спектры флуоресценции хлороформного экстракта из клеток РПЭ глаза мыши дозозависимо сдвигаются в более коротковолновую область – от 547 нм до 538 нм. В образцах хлороформных экстрактов из РПЭ глаза мыши изначально присутствует основной флуорофор – А2Е. После воздействия ионизирующего излучения – гамма-излучения или ускоренных протонов в дозах 1-4 Гр хроматографическая картина хлороформных экстрактов существенно меняется: наблюдается снижение количества А2Е, количество веществ, содержащихся в начальных пиках хроматограммы увеличивается, относительное содержание полностью-*транс*-ретиная (ПТР) падает, а количество веществ, содержащихся в конечных пиках, напротив, нарастает. Таким образом, флуоресцентный и ВЭЖХ анализ показывает изменения соотношения различных бисретиноидов в клетках РПЭ при действии ионизирующего излучения.

Такого же рода изменения наблюдаются и при действии видимого света на ЛГ, и в патологической (дегенеративной) сетчатке [2]. На спектрах флуоресценции хлороформного экстракта сетчатки наблюдается аналогичная картина изменения содержания бисретиноидов ЛГ при воздействии ионизирующего излучения, как и в случае РПЭ. Следует подчеркнуть, что в образцах хлороформных экстрактов из сетчаток глаза мыши изначально присутствует изомеры ретиналя (11-*цис* и *транс* формы), а также А2Е, как и у человека [5]. При действии ионизирующего излучения количество ПТР в сетчатке, как и в РПЭ, падает. Но есть и существенное отличие. В сетчатке, в отличие от РПЭ, количество бисретиноида А2Е нарастает. Можно предположить, что избыток ПТР, высвобождающегося в результате радиолиза зрительного пигмента родопсина, взаимодействует с фосфатидилэтаноламином в фоторецепторной мембране наружного сегмента зрительной клетки, в результате чего и образуется А2Е.

Выводы.

Отработана методика по облучению мышей ускоренными протонами и гамма излучением как тотально, так и в пике Брэгга. Получены образцы РПЭ и сетчатки из глаз мышей, и отработана методика ВЭЖХ анализа бисретиноидов в хлороформных экстрактах, полученных из ткани РПЭ и сетчатки. Показано, что действие ионизирующего излучения в дозах 1-4 Гр приводит к сдвигу в коротковолновую область максимума спектра флуоресценции хлороформного экстракта, полученного как из РПЭ, так и из сетчаток глаз мышей. ВЭЖХ анализ показал изменение относительного содержания отдельных бисретиноидов в экстрактах из РПЭ и сетчатки, а также ПТР в экстрактах сетчатки. Неинвазивная регистрации аутофлуоресценции глазного дна человека, подвергнувшегося радиационному облучению, может стать диагностическим методом обнаружения окислительного стресса в структурах глаза, что может также отражать возникновение окислительного стресса в организме.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-01028

Список литературы.

1. M. Boulton, A. Dontsov, J. Jarvis-Evans, M. Ostrovsky. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. // J.Photochem. Photobiol. B: Biol., 1993. V.19. P.201-204
2. Feldman T.B., Yakovleva MA., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology // Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, V. 407 (4), P. 1075-1088
3. Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. // BiochemBiophys Res Commun. 2011; V. 414 (4). P. 795-800.
4. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
5. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1998. V. 95(25). P. 14609-13.
6. Sparrow J.R., Gregory-Roberts E., Yamamoto K., Blonska A., Ghosh S.K., Ueda K., Zhou J. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. // Prog. Retin. Eye Res. 2012. V. 31. P. 121-135.