

**«Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц
различных энергий»**

**СПИСОК АВТОРОВ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ИНСТИТУТАМ,
РАСПОЛОЖЕННЫМ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ГОРОДАМ**

Дубна, ЛРБ ОИЯИ:

Аксенова С.В., Алейников В.Е., Белов О.В., Белокопытова К.В., Бескровная Л.Г., Блага П., Борейко А.В., Бугай А.Н., Буденная Н.Н., Буланова Т.С., Васильева М.А., Виноградова Ю.В., Ву Т.Х., Говорун Р.Д., Душанов Э.Б., Жучкина Н.И., Заднепрянец М.Г., Иванов А.А., Ильина Е.В., Йежкова Л., Коваленко М.А., Кожина Р.А., Кокорева А.Н., Колтовая Н.А., Колесникова Е.А., Комова О.В., Комочков М.М., Корогодина В.Л., Кошлань И.В., Кошлань Н.А., Круглякова Е.А., Крылов А.Р., Крылов В.А., Кузьмина Е.А., Куцало П.В., Лесовая Е.Н., Лисы В., Ляхова К.Н., Лхагваа Б., Мунхбаатар Б., Насонова Е.А., Островский М.А., Панина М.С., Пархоменко А.Ю., Петрова Д.В., Северюхин Ю.С., Смирнова Е.В., Тиунчик С.И., Утина Д.М., Фадеева Т.А., Чаусов В.Н., Шванева Н.В., Шмакова Н.Л.

Армения, Ереван, ЕГУ:

Арутюнян Р.М.

Беларусь, Гомель, ИФ НАНБ:

Залеская Г.А.

Болгария, София, ИЭ БАН:

Аврамов Л. А.

София, НИЦРЗ:

Хаджидекова В.

Италия, Удине, UNIUD

Амбеси Ф.

Молдова, Кишинев, Ун-т АНМ:

Дука М.

Монголия, Улан-Батор, NUM:

Лхагва О.

Польша, Щецин (SU):

Черски К.

Россия, Москва, ИМБП РАН:

Труханов К.А., Штемберг А.С.

Россия, Москва, НИИ Фармакологии РАМН:

Кудрин В.С.

Россия, Москва, МГУ:

Козлова Е.К., Латанов А.В.

Россия, Москва, ИТЭФ:

Голубев А.А., Марков Н.В.

Россия, Москва, ИВНД и НФ РАН:

Асеев Н.А.

Россия, Сочи, НИИ МП:

Латин Б.А.

Румыния, Бухарест, UMF:

Верга Н.

Яссы, UAIC:

Лука Д.

Яссы, IBR:

Вокица Г.

Словакия (СУ):

Дубничкова М.

Чехия, Брно, IBR ASCR:

Козубек С., Фальк М., Лукашова Е.

Прага, STU:

Мучка В.

Ржеж, NRI:

Штефаник М.

ЮАР, Кейптаун, iThemba Labs

Слабберт Дж.

Руководители проекта:

Красавин Евгений Александрович

Тимошенко Геннадий Николаевич

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО _____

ДАТА НТС ЛАБОРАТОРИИ 15.05.17 НОМЕР ДОКУМЕНТА № 110-4 .

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ФИЗОБОСНОВАНИЯ НА СЕМИНАРЕ ЛАБОРАТОРИИ
26.04.17

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА
**«Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц
различных энергий»**

ШИФР ТЕМЫ

УТВЕРЖДЕН ДИРЕКТОРОМ ОИЯИ _____

СОГЛАСОВАНО

ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ _____

ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ _____

ПОМОЩНИК ДИРЕКТОРА ПО
ЭКОНОМИЧЕСКИМ
И ФИНАНСОВЫМ ВОПРОСАМ _____

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР _____

НАЧАЛЬНИК НОО _____

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ _____

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ _____

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА _____

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА _____

ОДОБРЕН

ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ _____

«Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц различных энергий»

<u>Введение</u>	5
<u>Обоснование Проекта</u>	8
1. Исследование закономерностей и механизмов возникновения молекулярных нарушений структуры ДНК и их репарации в клетках млекопитающих и человека при действии излучений с разной ЛПЭ <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	8
2. Получение сравнительных данных о закономерностях индукции генных и структурных мутаций в клетках млекопитающих и низших эукариот при действии редко и плотно ионизирующих излучений с разными ЛПЭ.....	14
3. Исследование механизмов повреждения и восстановления сетчатки глаза после воздействия ТЗЧ.....	16
4. Исследование характера повреждений и закономерностей гибели клеток центральной нервной системы. Выявление функциональных и морфологических нарушений в ЦНС в результате действия тяжелых заряженных частиц.....	18
5. Математическое моделирование радиационно-индуцированных эффектов ионизирующих излучений с разной ЛПЭ на молекулярном и клеточном уровне. Разработка и анализ математических моделей молекулярных механизмов нарушений структуры и функций центральной нервной системы в результате действия ионизирующих излучений.....	21
6. Расчет защит новых ядерно-физических установок, оценка радиационной обстановки и разработка систем радиационной безопасности.	24
<u>Основные этапы работы в рамках проекта</u>	26
<u>Оценка стоимости и ресурсов</u>	30
<u>Аннотация</u> (отдельное приложение)	

Введение

Настоящая тема является продолжением ранее выполненных исследований в рамках темы «Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц различных энергий» **04-9-1077-2009/2017**. За данный период разработки были нацелены, главным образом, на изучение генетических нарушений в клетках различного происхождения и проведение радиационно-физиологических исследований. Они касались изучения закономерностей и механизмов молекулярных нарушений в генетических структурах клеток млекопитающих и человека, формирования мутаций различного типа в клетках низших и высших эукариот; исследований радиационных повреждений в структурах органа зрения и центральной нервной системы при действии ионизирующих излучений разного качества. В ходе радиационно-генетических исследований детально изучены закономерности образования и кинетики репарации двунитевых разрывов ДНК при действии ускоренных ионов бора и неона с энергией 50 МэВ/нуклон и высокоэнергетичных ионов углерода с энергией 500 МэВ/нуклон. Показаны резкие различия в пространственном распределении повреждений в ядрах клеток человека при γ -облучении и действии ускоренных тяжёлых ионов. При γ -облучении повреждения распределяются в ядрах клеток случайным образом, при действии тяжёлых ионов локализуются по ходу треков заряженных частиц, формируя «треки» из двунитевых разрывов ДНК кластерного типа. Установлено, что размеры и состав кластеров определяется физическими характеристиками действующих излучений. Совместно со специалистами Института биофизики ЧАН (Чехия, Брно) выполнен цикл работ по изучению кинетики индукции и репарации повреждений ДНК в нормальных и опухолевых клетках при действии γ -квантов, протонов различных энергий и ускоренных ионов неона. Исследованы закономерности мутационного процесса в клетках млекопитающих при действии излучений широкого диапазона линейных передач энергии (ЛПЭ) в различные сроки после радиационного воздействия. Выявлено, что максимальный выход мутантных субклонов зависит от ЛПЭ ускоренных ионов. При более высоких ЛПЭ наблюдается смещение максимума выхода мутантов с увеличением времени экспрессии облученных клеток. Зависимость имеет экспоненциальный характер, что может указывать на качественные различия повреждений генетических структур при разных значениях ЛПЭ, обуславливающих данное смещение.

В ходе выполнения радиационно-физиологических исследований выполнен большой цикл исследований по определению зависимости морфологических и функциональных изменений сетчатки глаза мелких лабораторных животных от величины дозы воздействия

гамма-квантов, протонов 170 МэВ и генотоксического химического агента (метилнитрозомочевина). Показано, что ускоренные протоны в дозе 25 Гр вызывают морфологические изменения в сетчатке глаза, возрастание экспрессии индуцибельных белков, связанных с апоптотической гибелью фоторецепторных клеток в сетчатке, что ведет к утрате функциональной активности сетчатки. Выявлена способность зрелой сетчатки глаза мышей к клеточному и функциональному восстановлению и к адаптивному ответу. Совместно со специалистами Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН ГКНЦ Институт медико-биологических проблем РАН изучено влияние ускоренных ионов углерода с энергией 500 МэВ/нуклон на метаболизм ключевых нейромедиаторов головного мозга грызунов. Определены наиболее чувствительные области мозга к облучению, в которых метаболизм менялся в ранние и поздние сроки после радиационного воздействия.

Наряду с экспериментальными исследованиями был выполнен значительный объём теоретических работ по математическому моделированию радиационно-индуцированных эффектов. Построены математические модели мутационного процесса, индуцированного ультрафиолетовым излучением, в репарационно-дефицитных бактериальных клетках *E.coli*. и репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках высших организмов при действии ионизирующих излучений разного качества. В рамках разработанных подходов возможно описание кинетики формирования и элиминации кинетики ДР ДНК. Показано, что подход применим для моделирования кинетики репарации ДР ДНК в клетках, содержащих дефекты в системе репарации.

Предложена и обоснована новая концепция радиационного риска для пилотируемых межпланетных полётов, в рамках которой радиационный риск для космонавтов связывается, главным образом, с действием тяжёлых ядер галактических космических лучей на структуры центральной нервной системы. Такое влияние в ходе полёта может привести к изменениям высших интегративных функций мозга и обусловить нарушения операторской деятельности экипажей. Новая парадигма обуславливает изменение основных направлений научных исследований в области космической радиобиологии, обуславливает необходимость разработки новых нормативных документов обеспечения радиационной безопасности при пилотируемых полётах в дальний космос.

С учетом изложенного, решение затронутых фундаментальных и практических проблем, настоятельно требует дальнейшего детального изучения закономерностей и механизмов действия тяжёлых заряженных частиц на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях биологической организации. Исследования

молекулярных нарушений в генетических структурах, прежде всего, важны в плане анализа возникновения наиболее тяжёлых повреждений ДНК – двунитевых разрывов. Внедрённый и развитый в ЛРБ новый эффективный метод анализа кластерных двунитевых разрывов ДНК (метод ДНК-фокусов) позволит изучить формирование наиболее тяжёлых повреждений генетического аппарата при действии тяжёлых ионов. Даст возможность исследовать формирование и репарацию генетических повреждений, как в пролиферирующих тканях, так и в высокодифференцированных элементах нервной системы. Использование в экспериментах клеток различных организмов (низших эукариот, клеток млекопитающих и человека) позволит оценить выход генных и структурных мутаций при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ, образование цитогенетических нарушений при разных дозах облучения заряженными частицами различных энергий. Развитые в ЛРБ подходы к решению проблемы хромосомной нестабильности, реакции клеток млекопитающих и человека на действие малых доз облучения разными видами ионизирующих излучений позволит выяснить механизмы, лежащие в основе этих реакций, понять вклад физико-химических процессов (активных форм кислорода) и индуцибельных репарационных механизмов в их реализацию. Выяснение этих фундаментальных клеточных процессов как ответов на воздействие заряженных частиц различных энергий может составить основу к пониманию тканевых реакций высокодифференцированных клеточных систем – сетчатки глаза и различных структур центральной нервной системы на лучевое воздействие. В свою очередь, эти исследования позволят оценить нарушения интегративной целостности системы – нарушений когнитивной сферы, поведенческих реакций. Совершенно очевидна практическая направленность такого рода комплексных исследований для различных сфер деятельности.

Основой успешной реализации запланированных работ является наличие в ОИЯИ уникальной базы ускорителей тяжёлых ионов. Прежде всего, ускорителя Нуклотрон, на пучках которого возможно выполнение комплекса исследований на молекулярном, цитогенетическом и организменном уровнях биологической организации, и циклотрона МЦ400, позволяющего проводить широкий спектр молекулярных и цитогенетических исследований. Энергии ионов, доступных на этих ускорителях, перекрывают значительную часть энергетического диапазона ядер ГКИ.

Работы планируется проводить в сотрудничестве со специалистами Ереванского государственного университета (г. Ереван, Армения), Института радиобиологии НАНБ (г. Гомель, Беларусь), Института электроники БАН (г. София, Болгария), ИЯИЯЭ БАН (г. София, Болгария), Университета Академии Наук Молдовы (г. Кишинев, Молдова),

Монгольского государственного университета (г. Улан-Батор, Монголия), Щецинского университета (г. Щецин, Польша), Института медико-биологических проблем РАН (г. Москва, Россия), НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАМН (г. Москва, Россия), Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова (г. Москва, Россия), Института теоретической и экспериментальной физики (г. Москва, Россия), Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (г. Москва, Россия), Научно-исследовательский институт медицинской приматологии (г.Сочи, Россия), Медицинского университета им. Каролы Давилы (г. Бухарест, Румыния), Университета им. Александра Иоана Кузы в Яссах (г. Яссы, Румыния), Института биологических исследований Яссы Национального института исследований и развития биологических наук (г. Яссы, Румыния), Университета Коменского в Братиславе (г. Братислава, Словакия), Института биофизики Академии наук Чешской Республики (г. Брно, Чехия), Чешского технологического университета в Праге (г. Прага, Чехия), Института ядерных исследований (г. Ржеж, Чехия), iThemba Labs (г. Кейптаун, ЮАР), Университета Удине (г. Удине, Италия). Форма сотрудничества с институтами-участниками проекта будет включать совместную подготовку и проведение исследований, а также участие на уровне визитёров.

Обоснование Проекта

1. Исследование закономерностей и механизмов возникновения молекулярных нарушений структуры ДНК и их репарации в клетках млекопитающих и человека при действии излучений с разной ЛПЭ in vivo и in vitro.

Ионизирующие излучения индуцируют широкий спектр повреждений ДНК клеток. Одновременное нарушение целостности двух нитей ДНК является наиболее тяжёлым повреждением генетических структур, приводящим к гибели клеток, формированию различных структурных изменений хромосом, инициирующих злокачественную трансформацию клеток. Двунитевые разрывы (ДР) ДНК образуются либо вследствие прямой передачи энергии локальному участку ДНК, приводящей к разрыву двух комплементарных участков (прямые ДР), либо могут сформироваться из других повреждений в процессе клеточного восстановления как «издержки репарации» (энзиматические ДР). Отличительной чертой действия заряженных частиц на генетические структуры клеток является формирование кластерных ДР ДНК, не характерных для действия электромагнитных видов излучений. Кластерные ДР ДНК генерируются отдельным треком заряженной частицы в пределах одного или двух витков спирали ДНК и состоят из одного или нескольких ДР ДНК и любой суперпозиции

поврежденных оснований, абазических сайтов (апуриновых или апиримидиновых) и одностранных разрывов ДНК. Выход радиационно-индуцированных кластерных ДР ДНК возрастает с увеличением плотности ионизирующего излучения, т.е. с ростом линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения. На основании симуляции трековых структур предполагается, что более 90 % ДР ДНК, индуцируемых ионизирующими излучениями с высокой ЛПЭ, формируются в комплексе с другими повреждениями. Однако, прямой анализ кластерных повреждений ДНК в клетках крайне затруднен.

Показано, что кластерные ДР ДНК более сложны для клеточной «машинерии», осуществляющей репарацию в клетке, чем одиночные (индивидуальные) повреждения. Репарация ДР ДНК осуществляется различными путями. При этом точная безошибочная репарация ДР зависит от многих факторов, но, в значительной степени, от характера сформировавшегося повреждения: особенностей концевых групп ДР, степени кластеризации (например, одновременного нарушения целостности двух нитей ДНК и повреждения ковалентных связей оснований в различных комбинациях и т.д.), плотности распределения повреждений, специфики работы различных путей репарации. Описано большое количество белков, участвующих в многоэтапном процессе репарации ДР, образующих сложные репарационные комплексы. Несомненно, что эффективность и полнота осуществления репарационного процесса повреждений такого типа, зависит от физических свойств воздействующего ионизирующего излучения. Установлено, что кластерные повреждения ДНК тормозят работу репарационных ферментов, увеличивая время репарации и снижая её эффективность. В результате кинетика репарации замедляется, при этом часть повреждений, очевидно, наиболее сложных, длительное время остается неотрепарированной. Показано, что неотрепарированные кластерные повреждения могут передаваться дочерним клеткам, что с большой вероятностью приводит их к крайне драматическим последствиям.

Количественный анализ закономерностей формирования ДР ДНК и их репарации в пострadiационный период является исключительно важным при выяснении фундаментальных механизмов лучевых реакций клеток: летальных и мутагенных эффектов облучения, апоптотических реакций, трансформирующего влияния облучения. Разработанные в последние годы методы анализа молекулярных нарушений в ДНК клеток различных организмов позволяют оценивать повреждения не только в клеточных ансамблях, но и в индивидуальных клетках. Это метод ДНК-комет, метод иммуноцитохимического и иммуногистохимического окрашивания белков репарации повреждений ДНК и цитометрические методы.

Методы иммуноцитохимического и иммуногистохимического окрашивания позволяют не только выявлять повреждения в ядрах индивидуальных клеток и в срезах тканей, но при определённых условиях и визуализировать повреждения ДНК, формирующиеся вдоль треков прохождения ускоренных тяжелых ионов через клеточные ядра. Такой подход делает возможным анализ тонкой структуры кластерных повреждений ДНК, позволяет учитывать количество повреждений по ходу трека тяжёлой заряженной частицы.

Как уже указывалось, кластерные повреждения ДНК представляют комплекс повреждений разного типа, формирующихся в локальном микрообъеме в результате прохождения тяжёлой заряженной частицы. Иммуноцитохимическое мечение белков, принимающих участие в процессах репарации различных повреждений, позволяет анализировать качественный и количественный состав отдельных кластеров в треке. Так, например, меченные флуоресцентными красителями белки γ -H2AX и 53BP1 позволяют выявить ДР ДНК, XRCC1 – одностранные разрывы, OGG1 – модифицированные основания (8-оксогуанин) и др. Использование иммуноцитохимических методов при проведении планируемых исследований поможет ответить на вопрос – влияет ли распределение различных видов повреждений ДНК на способность клеток к репарации и если – да, то каким образом. Выяснить – как различные белки узнают кластерные повреждения, как быстро происходит узнавание различных типов повреждений ДНК, какие белки первыми устремляются к месту повреждения ДНК.

Как известно, ДР ДНК репарируются, главным образом, двумя различными механизмами репарации – путём гомологичной рекомбинации (HR) и механизмом негомологичного воссоединения концов (NHEJ). Показано, что при действии редкоизирующей излучений большая часть ДР ДНК репарируется в ходе NHEJ. Однако в настоящее время остается неясным - по какому пути и с какой эффективностью репарируются кластерные ДР ДНК, формирующиеся после воздействия, преимущественно, плотноизирующей видов излучений. При изучении данного вопроса абсолютно необходимыми представляются данные, которые также будут получены с применением метода иммуноцитохимии. Визуализация белков-участников различных путей репарации ДР ДНК (RAD51 – HR, DNA PKcs – NHEJ) позволит оценить вклад каждого из путей репарации при действии излучений разного качества. В совокупности с применением техники иммуноцитохимического окрашивания использование метода qRT-PCR (quantitative reverse transcription PCR) позволит исследовать относительную экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в репарации ДР ДНК (RAD51, DNA PKcs, NBS1, MRE11 и др.).

В последние годы исследования по изучению действию плотно ионизирующих излучений на организм стали еще более актуальными не только в связи с работами связанными с радиотерапией опухолей, но и в свете реализации планов длительных пилотируемых межпланетных миссий. Поэтому в настоящее время ведется значительное число исследований действия высокоэнергетических ТЗЧ, являющихся компонентами галактических космических лучей, на важнейшие критические системы или структуры организма. Особый интерес представляют исследования с использованием различных модельных биологических систем, направленные на выявление повреждений, индуцируемых ТЗЧ, инициирующих и способствующих развитию дисфункций центральной нервной системы, онкогенеза и дегенеративных процессов. Особый интерес представляет изучение механизмов формирования и репарации ДР ДНК, как одних из наиболее серьезных повреждений генома, в клетках гиппокампа, поскольку эти клетки, в отличие от большинства клеток центральной нервной системы, сохраняют пролиферативную активность, т.е. способность к нейрогенезу. Установлено, что именно гиппокамп играет ключевую роль в формировании долговременной памяти, в интеграции получаемой мозгом информации и её распределении в высших отделах мозга, а так же участвует в реализации когнитивных функций. Особый интерес представляет изучение вклада пролиферирующих прогениторных клеток в радиочувствительность гиппокампа.

Развитые в ЛРБ иммуноцитохимические методы определения повреждений ДНК, вызванных воздействием тяжёлых заряженных частиц, представляются весьма перспективными при выяснении молекулярных нарушений в нейронах различных отделов центральной нервной системы экспериментальных животных. Для этих целей в рамках проекта оптимизирован метод иммуногистохимического окрашивания, позволяющий детектировать повреждения ДНК в тонких срезах тканей головного мозга лабораторных животных, облученных *in vivo*. Кроме специфических маркеров повреждений ДНК таких, как 53BP1 и γ H2AX планируется использовать маркеры различных клеточных субпопуляций – NeuN, doublecortin, GFAP, BrdU, calbindin. Они необходимы для исследования влияния облучения на процессы взрослого нейрогенеза гиппокампа, обуславливающего пластичность мозга. Процесс взрослого нейрогенеза протекает в несколько этапов, на каждом из которых будущие нейроны можно идентифицировать по экспрессии специфического маркера. GFAP – маркер глиальных стволовых клеток. Из глиальных стволовых клеток после ассиметричного деления образуются клетки предшественники нейронов, наиболее чувствительные к воздействию облучения. NeuN, doublecortin – распространенные маркеры субпопуляций зрелых и незрелых нейронов, соответственно. BrdU – демонстрирует общую совокупность делящихся клеток.

Нарушения высших интегративных функций мозга заключаются не только в нарушениях механизма пластичности и в нарушениях координации движений. Одной из структур участвующей в скоординированном выполнении действий является мозжечок. Кроме того, мозжечок содержит около половины всех нейронов головного мозга, что подчеркивает его исключительную важность для сохранения его нормального функционирования. Анатомически мозжечок вынесен за пределы большого мозга и связан с ним за счет взаимодействия с клетками Пуркинье. Calbindin – специфический маркер клеток Пуркинье и один из главных кальций-связывающих белков, которые снижают уровень ионов кальция и их транспорт. Показано, что повышенная экспрессия calbindin блокирует многие проапоптотические пути. В частности calbindin ингибирует апоптотическую активность индуцированную амилоидом- β в нейрональных и глиальных клетках.

Кроме того, для более детального исследования влияния ТЗЧ на клетки головного мозга необходима оптимизация методики выделения и ведения первичной культуры гиппокампа из крыс возраста P0-P1. Это позволит проводить облучение образцов ТЗЧ на установке «Геном» циклотрона У400-М Лаборатории ядерных реакций ускоренными ионами с разными физическими характеристиками.

Одной из актуальных задач в радиобиологии является задача по изучению модификаций радиочувствительности в клетках и тканях организма. Такие исследования крайне важны для разработки подходов к модуляции радиочувствительности клеток иммунной системы. 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. Эндотоксический центр ЛПС - его липид А. Липид А в низких дозах проявляет высокую биологическую активность и может быть модуляторами иммунного ответа. Как известно, лимфоциты обладают высокой чувствительностью к воздействию ионизирующего излучения, что позволяет использовать их как хорошую мишень для изучения влияния иммуномодуляторов, таких как липид А.

В рамках продолжения работ планируется изучить:

- закономерности формирования кластерных ДР ДНК при действии ускоренных тяжёлых ионов в ядрах фибробластов кожи человека и радиорезистентных опухолевых клетках U87;

- кинетику репарации кластерных ДР ДНК в пострадиационный период в ядрах фибробластов кожи человека и радиорезистентных опухолевых клетках U87;
- формирование и кинетику репарации кластерных ДР ДНК в пострадиационный период при действии ускоренных тяжёлых ионов в ядрах клеток предшественников и зрелых нейронах, а также глиальных клетках ЦНС млекопитающих с использованием маркеров клеточных субпопуляций - NeuN, doublecortin, GFAP, BrdU, calbindin;
- закономерности формирования различных типов повреждений ДНК (однонитевых разрывов ДНК, повреждений оснований, комплексных повреждений ДНК) при действии ТЗЧ в ядрах фибробластов человека;
- вклад различных путей репарации ДР ДНК в фибробластах человека при действии излучений разного качества методом иммуноцитохимического окрашивания белков репарации RAD51 (HR) и DNA PKcs (NHEJ);
- экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в репарации (RAD51, DNA PKcs, NBS1, MRE11 и др.) в фибробластах человека при действии ТЗЧ;
- закономерности индукции апоптоза в фибробластах кожи человека, в нейронах ЦНС млекопитающих при действии ускоренных тяжёлых ионов;
- экспрессию генов, кодирующих белки и каспазы, участвующие в индукции апоптоза в фибробластах человека и нервных клетках при действии заряженных частиц различных энергий;
- закономерности формирования и репарации ДР ДНК в раковых клетках и нормальных клетках, расположенных вблизи опухоли, полученных от пациентов, проходящих радиотерапевтическое лечение;
- закономерности формирования и элиминации повреждений *in vivo* и *in vitro* в нейронах ЦНС млекопитающих при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов;
- молекулярные нарушения в нейронах гиппокампа и мозжечка в различные сроки (до 3-х месяцев) после облучения тяжелыми заряженными частицами;
- влияние возрастных изменений ЦНС на индукцию и репарацию повреждений в нейронах млекопитающих при действии ионизирующих излучений разного качества;
- закономерности индукции ДР ДНК и кинетику репарации ДР ДНК в нейронах ЦНС млекопитающих и лимфоцитах периферической крови млекопитающих при действии ионизирующего излучения разного качества в условиях влияния иммуномодуляторов.

2. Получение сравнительных данных о закономерностях индукции генных и структурных мутаций в клетках высших и низших эукариот при действии редко- и плотно ионизирующих излучений с разными ЛПЭ

Вопросы мутагенного действия ионизирующих излучений разного качества, в особенности ускоренных тяжелых ионов, на клетки млекопитающих и человека по-прежнему актуальны и требуют пристального изучения. В экспериментах по облучению бактериальных клеток различных линий ускоренными тяжёлыми ионами широкого диапазона ЛПЭ в ЛРБ получены уникальные данные, свидетельствующие о различном характере индукции генных и структурных мутаций (Красавин Е.А., Козубек С. 1991, Борейко А.В., Красавин Е.А. 2011). Эти различия касаются характера дозовых зависимостей (линейно-квадратичная для генных мутаций и линейная для мутаций структурного типа), отражающих различия в природе молекулярных премутационных повреждений и в механизмах реализации регистрируемых мутаций.

Планируемые в рамках проекта работы являются продолжением начатых ранее в ЛРБ исследований о закономерностях индукции генных и структурных мутаций в клетках млекопитающих при действии излучений с разными ЛПЭ. Проведена серия экспериментов по исследованию радиационно-индуцированного мутагенеза в клетках китайского хомячка (линия V79) после воздействия ускоренных ионов с различной ЛПЭ (50, 116, 138, 153 кэВ/μм) и γ-облучения. Обнаружено, что его проявление зависит от сроков высева облученных клеток («времени экспрессии» мутаций) на селективную питательную среду с 6-тиогуанином и ЛПЭ излучений. При увеличении периода экспрессии отмечено увеличение уровня мутагенеза до максимального значения с последующим его снижением до спонтанного уровня. Положение этого максимума зависело от ЛПЭ ускоренных ионов. С увеличением ЛПЭ значение максимума смещается в сторону более длинных «времен экспрессии». На основании проведенных исследований можно предположить, что повышенный уровень радиационно-индуцированного мутагенеза определяется возросшей хромосомной нестабильностью популяции облученных клеток, и его проявление в разные «времена экспрессии» зависит от тяжести первоначальных повреждений.

В рамках данного направления планируется:

- провести цитогенетический и молекулярный анализ полученных мутантных субклонов;
- исследовать хромосомную и геномную нестабильность у потомков облученных клеток.

На основе этих данных выявить особенности мутагенного действия редко- и плотно ионизирующих излучений на клетки млекопитающих и оценить мутагенное действие излучений разного качества.

На модельной системе одноклеточных эукариот (одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*) предполагается продолжить исследование закономерностей индукции генных и структурных мутаций ускоренными тяжелыми заряженными частицами. Молекулярные исследования последних лет свидетельствуют о высокой степени общности в генетической организации клеток низших эукариот и клеток млекопитающих, обнаруживают большое количество гомологичных генов и белков и сходство базовых клеточных механизмов. Важно заметить, что генетический контроль и молекулярные механизмы таких фундаментальных клеточных процессов как репликация, репарация, транскрипции наиболее полно изучены у дрожжей. Разработаны удобные генетические системы, позволяющие определять любые молекулярные события. Поэтому дрожжи часто используют в качестве модельной системы для изучения базовых молекулярных механизмов эукариотической клетки. Сравнение полученных результатов на клетках дрожжей и человека позволит оценить различия в ответе на облучение клеток высших и низших эукариот и экстраполировать на клетки человека данные по геному мутагенезу, полученные на клетках дрожжей.

В рамках данного направления планируется:

- завершить исследование действия γ -квантов, используемого в качестве стандартного облучения, на различные генетические системы дрожжей, позволяющие тестировать все типы мутационных событий;
- изучить влияние митохондриального генома, как одного из источников окислительного стресса, на мутагенное и летальное действие излучения с использованием ρ^- и ρ^0 мутаций митохондриального генома дрожжей;
- отработать методику количественного определения АФК в клетках дрожжей с использованием флуоресцентного окрашивания;
- провести измерения уровня АФК в клетках дрожжей при облучении γ -квантами и тяжелыми ионами на микропланшетном ридере Synergy H1m (BioTek Instruments, Inc.);

В результате данных работ предполагается получить данные о закономерностях индукции генных и структурных мутаций в клетках высших и низших эукариот при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ частиц.

3. Исследование механизмов повреждения и восстановления сетчатки глаза после воздействия ТЗЧ

Исследование действия ионизирующих излучений на молекулярные механизмы, контролирующие функции центральной нервной системы, является частью работ, связанных с оценкой радиационного риска при планировании длительных пилотируемых полётов за пределами магнитосферы Земли. Исследования лежат в области фундаментальной проблемы повреждения и восстановления терминально дифференцированных клеток и состоящих из них тканей. Сетчатка – состоит из терминально дифференцированных клеток, утративших способность к делению. Такие клетки характеризуются сравнительно высокой устойчивостью к воздействиям факторов окружающей среды. Показано, что клеточные элементы сетчатки, как и нейроны ЦНС, сравнительно устойчивы к радиационному воздействию. Вместе с тем, необходимо указать, что значительный контингент людей оказывается в ситуации, когда уровень токсического воздействия на сетчатку превышает уровень ее устойчивости, либо тип воздействия не является для неё адаптивным. Например, при длительных полетах человека в космос и при радиационной терапии опухолей мозга и глаз (ретинобластомы и меланомы глаз).

В космическом пространстве основным поражающим сетчатку фактором являются ускоренные протоны и тяжелые заряженные частицы. Обнаружено, что у мышей непосредственно после орбитального полета повышается частота спонтанного апоптоза в слое ганглиозных клеток сетчатки и в клетках ретинального пигментного эпителия, возрастала экспрессия некоторых генов в сетчатке, продуцирующих окислительный стресс (Мао et al. 2013). В совокупности эти данные указывают на то, что отдаленный риск возникновения и развития дегенерации сетчатки существенно возрастает. Поскольку в настоящее время не существует сколько-нибудь эффективных методов лечения дегенеративных заболеваний сетчатки и поскольку развитие этих заболеваний ведет к частичной или полной потере зрения, то серьезность этого риска трудно переоценить. Результаты наблюдений на животных коррелируют с известным фактом, что у 30% астронавтов после полетов отмечается снижение остроты зрения (Mader et al. 2011, 2013).

В результате радиотерапевтического курса наблюдаются цистовидный макулярный отек, телангиактазия, глаукома, сухой глаз, катаракта. Радиационно-индуцированная патология зрения снижается при фракционированном облучении. Очевидно, что снижение дозы во фракциях и увеличение интервалов между фракциями увеличивают вероятность сетчатки к восстановлению. Знание показателей восстановления сетчатки после облучения позволит оптимизировать тактику терапевтического воздействия – достичь

высокой терапевтической эффективности при минимальном поражении здоровых тканей, в том числе и сетчатки.

Как видно, во всех перечисленных ситуациях наблюдается нарушение или потеря зрения, в основе которой лежит гибель клеток зрительной системы – фоторецепторных клеток, нейрональных клеток, клеток пигментного эпителия и др. В то же время, упоминаемая ранее высокая устойчивость клеток сетчатки к внешним воздействиям есть результат эволюционно возникших в этих клетках механизмов репарации и восстановления, которые обеспечивают регенерацию этих клеток и их функции.

Полученные ранее данные позволили выявить феномен восстановления сетчатки от генотоксического воздействия, показать его стимулирование небольшими дозами радиации, связь с апоптозом фоторецепторов сетчатки. В последующих исследованиях планируется изучить возможное участие в нем глиальных клеток Мюллера. Для этой цели предполагается использовать разработанную процедуру визуализации и детекции клеток Мюллера в микросрезах сетчатки по включению в них пролиферативного маркера BrUdR.

Планируется определить зависимость ответа сетчатки глаза мышей от вида и дозы облучения, что позволит охарактеризовать деструктивный эффект излучений в корреляции с функциональными изменениями сетчатки глаза. Вопрос об ионизирующем излучении как индукторе дегенерации сетчатки до настоящего времени остается нерешенным. В работе (Sannita et al. 2007) исследовали изменение электроретинографического профиля сетчатки у мышей в ответ на облучение глаз животных импульсами ядер C^{14} , генерируемых в синхротроне. Показано полное исчезновение а-волны и более чем 2-кратное снижение амплитуды b-волны из ЭРГ-профиля облученных животных. При этом никаких изменений в микроморфологии сетчатки не наблюдалось. В противоположность этим результатам, в работе (Mao et al. 2009) показано, что металлопорфирин снижал апоптоз фоторецепторов в сетчатке мышей облученных протонами в дозе 4 Гр (ниже пороговой для морфологических изменений в сетчатке). При облучении ретинальных эксплантов эмбрионов цыплят (Vazquez et al. 2000) морфометрически было показано, что дозы 0,1-0,5 Гр тяжелых ионов железа тормозят формирование нейритов ганглиозными клетками. Максимальное торможение наблюдалось при дозе 1 Гр. Однако при морфологическом анализе срезов сетчатки глаза крыс после пролета отдельных ускоренных ионов аргона с энергией 570 МэВ/нуклон (доза 1 Гр) во всех слоях облученной сетчатки не было обнаружено микроповреждений (Krebs et al. 1988, 1990). Отмечалось, что облучение сетчатки глаза крыс *in vivo* ускоренными ионами железа с энергией 450 МэВ/нуклон в дозе 2,5 Гр приводило к 20%-му снижению общего количества клеток пигментного эпителия, фоторецепторов и биполяров. Со

временем наблюдалось ее восстановление до контрольных значений. При облучении в дозе 0,1 Гр повреждающий эффект отмечен не был.

В ходе выполнения работ по данному направлению планируется:

- установить нарушения в клеточных элементах сетчатки, в первую очередь в глиальных клетках Мюллера и фоторецепторных клетках, при радиационном (гамма-излучения, ускоренных протонов, ТЗЧ) облучении глаз мышей;
- изучить функциональные нарушения сетчатки глаза при регистрации её электрической активности после радиационного (гамма-излучения, ускоренных протонов, ТЗЧ) облучения глаза мышей;
- охарактеризовать способность сетчатки к восстановлению после фракционированного радиационного воздействия.

Развиваемое направление является продолжением работ по исследованию механизмов повреждения и восстановления сетчатки после воздействия ионизирующих излучений разного качества.

4. Исследование характера повреждений и закономерностей гибели клеток центральной нервной системы (ЦНС). Выявление функциональных нарушений в ЦНС в результате действия тяжелых заряженных частиц

Радиобиологические исследования последних лет дают основание полагать, что радиационное поражение ЦНС является одним из основных компонентов риска, ограничивающих возможность осуществления полетов в дальний космос. Высокий уровень психологической напряженности в сочетании с комбинированным воздействием других негативных факторов полета (ионизирующие излучения, микрогравитация, измененная среда обитания, вибрация, гиподинамия, гипомагнитная среда и др.) определяет чрезвычайно высокий риск астенизации ЦНС, чреватой серьезными нарушениями работоспособности, вплоть до развития симптомов, характерных для болезни Альцгеймера (O'Banion et al. 2012). При этом основную опасность представляют тяжёлые ионы галактических космических лучей.). В ЛРБ экспериментах на грызунах и приматах были исследованы нарушения поведенческих функций и памяти, прогрессивно нарастающие в раннем и позднем пострadiационном периоде. Получены данные по нервным и нейрохимическим механизмам радиационных нарушений деятельности ЦНС. В частности, накоплены сведения по обмену моноаминов и их метаболитов в различных отделах мозга грызунов после облучения. Проведено морфологическое исследование состояния коры большого мозга и мозжечка при облучении иона углерода и низкоэнергетичными протонами с высокой ЛПЭ (Северюхин и др. 2017).

Разрабатываются фармакологические подходы к лечению радиационного поражения ЦНС при корпускулярном излучении (Ляхова и др. 2017). Высокая радиочувствительность ЦНС подтверждена клинически (Бушманов и др. 2017).

Механизмы радиационного поражения ЦНС принципиально отличаются от поражения других органов и систем организма млекопитающих при воздействии корпускулярного излучения. Если в основе поражения так называемых радиочувствительных органов, в первую очередь костного мозга, тимуса, кишечника и др. лежит торможение пролиферативной активности и гибель клеток, то при поражении ЦНС на первый план выступают функциональные нарушения, интерфазная гибель клеток и последующие склеротические, а в ряде случаев аутоиммунные процессы. Кроме того, нельзя не учитывать тот факт, что помимо прямого воздействия радиации на ЦНС имеет место так называемый метаболический эффект. Развитие метаболических нарушений в организме после поражения кроветворения и иммунитета опосредованно влияет на функцию ЦНС. Кроме того эпителий кровеносных сосудов является относительно радиочувствительным и поэтому поражение сосудистого русла ЦНС должно сказаться на ее функции. И конечно, имеются прямые подтверждения нарушения процессов нейрогенеза и развития апоптоза в головном мозге под влиянием облучения тяжелыми ядрами (Rola et al. 2004; Manda et al. 2008).

Очевидно, что радиационное поражение ЦНС, главной гомеостатической системы организма, может стать основной преградой для человечества на пути освоения дальнего космоса (Григорьев и др. 2015, 2017) и в этой связи решение классических вопросов радиобиологии: установление зависимостей доза облучения-эффект, время после облучения-эффект, вид излучения-эффект требуют своего решения. Кроме того, на базе данных о молекулярно-клеточных механизмах нарушений в ЦНС становится возможной разработка фармакологических методов коррекции этих нарушений.

В процессе проведения исследований по данному направлению планируется:

- в экспериментах на грызунах исследовать количественные закономерности развития морфо-функциональных нарушений в ЦНС при действии корпускулярного излучения – установить зависимость доза и время-эффект;
- сопоставить эффекты редко- и плотноионизирующих излучений в действии на ЦНС;
- установить вклад метаболических нарушений, развивающихся в облученном организме, на функцию ЦНС;
- исследовать фармакологические эффекты ноотропных препаратов на функцию ЦНС после корпускулярного излучения;

- оценить влияние традиционных противолучевых препаратов на функцию ЦНС при корпускулярном излучении.

Для решения задач, связанных с изучением обмена моноаминов и их метаболитов в различных отделах мозга грызунов после облучения, планируется использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионпарной хроматографии) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Данный метод является одним из широко используемых в нейрехимии способов, позволяющем в сжатые сроки определять концентрацию многих биологически значимых веществ, содержащихся в тканях мозга и принимающих активное участие в регуляции нейромедиаторного обмена.

Особое внимание в рамках проекта планируется уделить развитию флуорометрических методов анализа. В частности, наличие в ЛРБ много интегративной целостности функционального микропланшетного ридера Synergy H1 при определённом расширении приборной базы для пробоподготовки позволит реализовать достаточно широкий спектр таких методик в применении не только к культурам клеток, но и к тканям головного мозга лабораторных животных. Возможность детектирования светового сигнала, создаваемого флуоресцентными антителами, специфичными к определённому ферменту, позволяет оценивать его относительный уровень и временные характеристики взаимодействия с другими веществами путём измерения быстрой или медленной кинетики реакций. С помощью флуорометрических методов планируется выполнять работы по изучению апоптотической гибели нейронов в разных отделах мозга после облучения и по оценке нейрогенеза и развития нейронов. Обоснование выбора этих направлений связано с наличием в продаже специализированных наборов реагентов для выполнения этих видов анализа. Так, в качестве маркера апоптоза планируется рассматривать уровень каспазы-3, который можно оценить с применением ориентированного на этот фермент набора реагентов. Отдельные аспекты изменения нейрогенеза и развития нейронов можно отслеживать по трём другим маркерам, включающим BDNF (нейротрофический фактор мозга), GDNF (нейротрофический фактор глиальных клеток) и NGF (фактор роста нервов), к которым также имеются специализированные наборы для флуорометрического анализа.

Интерес к показателям, характеризующим процессы нейрогенеза и апоптоза, связан с рядом исследований, описанных в литературе, которые свидетельствуют о достоверном влиянии облучения тяжёлыми ядрами на реализацию этих механизмов в головном мозге (Rola et al. 2004; Casadesus et al. 2005; Guida et al. 2005; Manda et al. 2008). Делается предположение о связи повышения апоптоза и изменения нейрогенеза с пролонгированным нарушением поведенческих и когнитивных функций у лабораторных

животных. Таким образом, оценка этих показателей в различные периоды времени после воздействия излучений в широком диапазоне ЛПЭ является актуальной задачей, обладающей научной новизной.

В ходе выполнения работ по данному направлению планируется продолжить:

- исследование влияние облучения на обмен моноаминов и их метаболитов в различных структурах мозга (неокортекс, гиппокамп, гипоталамус, прилежащее ядро, префронтальная кора), принимающих активное участие в реализации поведения и моторного контроля, формирующих эмоциональные и мотивационные состояния;
- исследование уровня апоптотической гибели нейронов в различных отделах головного мозга грызунов в разные сроки после воздействия ионизирующих излучений (по определению активности Каспазы-3) ;
- изучить влияние излучений разного качества на нейрогенез, рост и развитие нейронов, в том числе:
 - оценить уровень нейротрофического фактора мозга BDNF и нейротрофического фактора глиальных клеток GDNF, играющих важную роль в пролиферации, дифференциации и развитии нейронов, в частности, в гиппокампе;
 - оценить уровень фактора роста нервов NGF в различных отделах головного мозга;
- морфофункциональное исследование отдалённых эффектов воздействия ионизирующих излучений разного качества;
- сопоставить результаты исследований, полученных при действии γ -квантов, протонов высоких энергий и ускоренных тяжёлых ионов;
- соотнести изменения, наблюдаемые на уровне молекулярных механизмов, с результатами поведенческих тестов.

5. Математическое моделирование радиационно-индуцированных эффектов ионизирующих излучений с разной ЛПЭ на молекулярном и клеточном уровне. Разработка и анализ математических моделей молекулярных механизмов нарушений структуры и функций центральной нервной системы в результате действия ионизирующих излучений

Методы математического моделирования и вычислительного эксперимента приобретают все большее значение в современной радиобиологии. В последние годы разработаны математические модели, описывающие различные этапы радиационного поражения живых систем – от нарушений, наблюдаемых на уровне отдельных молекул, вплоть до изменений в работе физиологических систем. В связи с отмеченными выше

проблемами космической радиобиологии возникает задача о теоретической оценке последствий действия ионизирующих излучений на функционирование ЦНС. В связи со сложностью проведения соответствующих экспериментов на живых организмах развитие методов математического и компьютерного моделирования в этом случае приобретает первостепенное значение.

Следует отметить, что современное состояние теоретических исследований в данной области можно охарактеризовать как находящееся лишь на начальных стадиях. Большую проблему здесь представляет выяснение молекулярных и клеточных механизмов, вызывающих нарушение поведенческих функций и памяти после радиационного воздействия. К известным из экспериментов результатам можно отнести изменение морфологии нейронных сетей в различных отделах головного мозга, потерю дендритных ветвей и дендритных шипиков, что ограничивает передачу сигналов. Выявлены нарушения работы синапсов, такие как изменения субъединиц глутаматных рецепторов, а также пула основных нейромедиаторов в синапсосамах. Отмечено также нарушение внутренних свойств мембраны нейронов и расположенных на ней ионных каналов. В различных отделах головного мозга выявлено изменение концентраций нейромодуляторов, например, дофамина, что может объяснить угнетение когнитивных функций. Известна корреляция снижения когнитивных функций в связи с тяжелыми повреждениями ДНК, в особенности двунитевыми разрывами, а также изменением в профиле экспрессии генов. Не последнюю роль здесь играет нарушение нейрогенеза в гиппокампе. Радиационно-индуцированные изменения проницаемости ионных каналов, в первую очередь, таких как кальций-активируемые калиевые каналы и кальций-проницаемые неселективные катионные каналы, играют значительную роль в программируемой гибели клеток - апоптозе. Отметим также такой важный эффект как развитие окислительного стресса, что приводит к пероксидации липидов и белков ионных каналов с нарушением их функционирования. Отдаленные последствия облучения влекут за собой расстройство когнитивных функций, таких как память и пространственная ориентация.

Для решения поставленных задач предполагается впервые реализовать совместное применение целого ряда расчётных методов из области моделирования транспорта заряженных частиц через вещество, радиационной химии, молекулярной динамики, биофизики полимеров, генетических регуляторных сетей, обработки и передачи информации в нейронных сетях и многих других. На уровне отдельных физиологических систем наибольшую трудность представляет совмещение различных методов в рамках одного модельного подхода. Данную проблему предполагается решить разделением

возникающих модельных задач согласно временным и пространственным масштабам протекающих процессов. При описании первичных этапов радиационного воздействия потребуется провести расчеты энерговыделения и процессов радиолиза в треках заряженных частиц, попадающих в популяцию нервных клеток со сложной морфологией, далее методами молекулярной динамики рассчитать и проанализировать ключевые типы радиационных повреждений в чувствительных молекулярных структурах (мембране, цитоскелете, ионных каналах и синапсах). Деполяризация мембраны, нарушение путей внутриклеточного транспорта и изменение функционирования ионных каналов и синаптической передачи в первую очередь скажутся на электрофизиологической активности нервных клеток. Необходим также учет реакции биологических регуляторных и репарационных систем на возникшие повреждения, что позволит оценить картину развития долговременных последствий облучения. Здесь в первую очередь выделим системы репарации ДНК, которые могут либо устранить большую часть повреждений, либо запустить программируемую гибель клетки. Соответствующее изменение экспрессии генов затронет и функционирование других частей клетки, например, рецепторов, что может заметно повлиять на электрическую активность нейрона. Кроме того, существенным фактором может стать развитие оксидативного стресса, что приведет в том числе и к нарушению работы мембранных ионных каналов и синаптических рецепторов. Но как рассматриваемые эффекты скажутся на осуществлении когнитивных функций, может дать ответ только моделирование изменений в активности нейронных сетей различных отделов головного мозга, преимущественно гиппокампа и префронтальной коры. В итоге, такая многоуровневая схема расчетов позволит теоретически оценить вероятность сбоев в работе различных видов памяти и обучения, что критически важно для оценки радиационных рисков.

В ходе продолжения выполнения работ по данному направлению предполагается:

- провести математическое моделирование механизмов индукции и репарации основных типов повреждений ДНК в клетках млекопитающих и человека;
- сформулировать математическую модель развития радиационно-индуцированного оксидативного стресса в нервных клетках;
- разработать методы теоретического расчета радиационно-индуцированных повреждений, возникающих в чувствительных структурах нервных клеток: мембране, цитоскелете, ионных каналах, синаптических контактах;
- сформулировать математические модели нейронных сетей головного мозга и произвести на их основе теоретическую оценку радиационно-индуцированных нарушений когнитивных функций

Планируемые в рамках проекта работы являются продолжением начатых ранее в ЛРБ ОИЯИ исследований по математическому моделированию радиационно-индуцированных эффектов.

6. Расчет защит новых ядерно-физических установок, оценка радиационной обстановки и разработка систем радиационной безопасности

Будут продолжены работы по развитию методов пучковой дозиметрии тяжелых ионов в приложении к радиобиологическим исследованиям на ускорителях заряженных частиц, физике защиты ядерно-физических установок и нейтронной спектрометрии, ядерной планетологии, астробиологии. Ежегодно планируется проведение двух радиобиологических экспериментов на пучках тяжелых ядер Нуклотрона и двух радиобиологических экспериментов на пучках ядер циклотрона МЦ400. Предполагается периодическое облучение биологических и объектов на медицинском пучке фазотрона и γ -терапевтической установке Рокус-М. Работы по космической тематике будут выполняться по согласованному с ИКИ графику работ.

В рамках направления планируется:

- обеспечить физическую поддержку проводимых на ускорителях заряженных частиц радиобиологических экспериментов;
- продолжить разработку методов исследования характеристик пучков тяжелых ионов и пучковой дозиметрии;
- продолжить участие в проектировании новых ядерно-физических установок ОИЯИ в части радиационной безопасности (в первую очередь, ускорительного комплекса NICA);
- продолжить совершенствование методов спектрометрии и радиометрии нейтронов на ядерно-физических установках ОИЯИ и в окружающей их среде;
- обеспечить функционирование экспериментального стенда “ДАН” и продолжить участие в работах по созданию, тестированию и градуировке приборов ядерной планетологии для исследования элементного состава поверхности небесных тел Солнечной системы и поиска водяного льда.

Работы по последнему пункту будут финансироваться в рамках договора ОИЯИ с Институтом космических исследований.

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
проекта «Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц
различных энергий»**

Наименования узлов и систем установки, ресурсов, источников финансирования			Стоимость узлов (тыс.долл) установки. Потребности в ресурсах.	Предложение лаборатории по распределению финансирования и ресурсов		
				2018	2019	2020
Необходимые ресурсы	Нормо-час	Нуклотрон	144 ч	48 ч	48 ч	48 ч
		Циклотрон МЦ400	288 ч	96 ч	96 ч	96 ч
		Рокус-М	300 ч	100 ч	100 ч	100 ч
		Мед. пучок фазотрона	102 ч	34 ч	34 ч	34 ч
Источник финансирования	Бюджет	Тема 1077	1135	316	374	445

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

/Красавин Е.А./

/Тимошенко Г.Н./

План-график работ

№	Наименование основных работ и этапов	Сроки работы (год, квартал)	
		Начало	Окончание
1	Определение закономерностей формирования кластерных ДР ДНК при действии ТЗЧ в ядрах фибробластов кожи человека, радиорезистентных опухолевых клетках U87.	2018, I	2020, IV
2	Исследование кинетики репарации кластерных ДР ДНК после действия ТЗЧ в ядрах фибробластов кожи человека, радиорезистентных опухолевых клетках U87.	2018, I	2020, IV
3	Изучение закономерностей формирования различных типов повреждений ДНК (однонитевых разрывов ДНК, повреждений оснований, комплексных повреждений ДНК) при действии ТЗЧ в ядрах фибробластов человека.	2018, I	2020, IV
4	Определение вклада различных путей репарации ДР ДНК в фибробластах человека при действии излучений разного качества методом иммуноцитохимического окрашивания белков репарации RAD51 (HR) и DNA PKcs (NHEJ).	2018, III	2020, IV
5	Изучение закономерностей формирования и кинетики репарации кластерных ДР ДНК при действии ТЗЧ в ядрах клеток предшественников и зрелых нейронах, а также глиальных клетках ЦНС млекопитающих с использованием маркеров клеточных субпопуляций - NeuN, doublecortin, GFAP, BrdU, calbindin.	2018, I	2020, IV
6	Проведение экспериментов по изучению экспрессии генов кодирующих белки, участвующие в репарации (RAD51, DNA PKcs, NBS1, MRE11 и др.) в фибробластах кожи человека при действии ТЗЧ.	2019, I	2020, IV
7	Изучение закономерностей индукции апоптоза в фибробластах кожи человека, в нейронах ЦНС млекопитающих при действии ТЗЧ.	2018, I	2020, IV
8	Проведение экспериментов по изучению экспрессии генов кодирующих белки и каспазы, участвующие в индукции апоптоза в фибробластах человека и нервных клетках при действии ТЗЧ.	2019, I	2020, IV
9	Изучение закономерностей формирования и репарации ДР ДНК в раковых клетках и нормальных клетках, расположенных вблизи опухоли, полученных от пациентов, проходящих радиотерапевтическое лечение.	2018, I	2020, IV
10	Изучение закономерностей формирования и элиминации ДР ДНК в клетках гиппокампа крыс <i>in vitro</i> с использованием первичной культуры гиппокампа, получаемой из крыс возраста P0-P1.	2018, I	2020, IV
11	Определение закономерностей формирования ДР ДНК при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов в нейронах ЦНС млекопитающих	2018, I	2019, IV
12	Исследование кинетики репарации ДР ДНК после	2018, I	2019, IV

	действия γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов в нейронах ЦНС млекопитающих.		
13	Изучение закономерностей формирования кластерных ДР ДНК при действии ТЗЧ в нейронах ЦНС млекопитающих.	2018, I	2020, IV
14	Исследование кинетики репарации кластерных ДР ДНК после действия ТЗЧ в нейронах ЦНС млекопитающих.	2018, I	2020, IV
15	Изучение влияния возрастных изменений ЦНС на индукцию повреждений в нейронах головного мозга млекопитающих при действии ионизирующих излучений разного качества.	2018, I	2020, IV
16	Изучение влияния возрастных изменений ЦНС на кинетику репарации ДР ДНК в нейронах головного мозга млекопитающих при действии ионизирующих излучений разного качества.	2018, I	2020, IV
17	Изучение закономерностей индукции и репарации ДР ДНК в нейронах ЦНС и лимфоцитах периферической крови млекопитающих при действии ионизирующего излучения разного качества в условиях влияния иммуномодуляторов.	2018, I	2019, IV
18	Исследование действия γ -квантов, протонов и ТЗЧ на нормальные (лимфоциты) и опухолевые (Cal51 клетки карциномы) клетки человека классическим метафазным методом и FISH-методом.	2018, I	2020, IV
19	Исследование мутагенного действия редко- и плотно ионизирующих излучений на клетках млекопитающих (V-79) в отдаленные сроки после облучения. Молекулярный и цитогенетический анализ геномной нестабильность мутантных субклонов.	2018, I	2020, IV
20	Определение закономерностей индукции генных и структурных мутаций в клетках дрожжей при действии излучений с разными ЛПЭ.	2018, I	2020, IV
21	Проведение экспериментов по исследованию нарушений в клеточных элементах сетчатки, в первую очередь в глиальных клетках Мюллера и фоторецепторных клетках, при радиационном (гамма-излучения, ускоренных протонов, ТЗЧ) облучении глаза мышей.	2018, I	2020, IV
22	Исследование функциональных нарушений сетчатки глаза при регистрации её электрической активности после радиационного (гамма-излучения, ускоренных протонов, ТЗЧ) облучения глаза мышей.	2018, I	2020, IV
23	Исследование способности сетчатки глаза к восстановлению после фракционированного радиационного воздействия.	2018, I	2020, IV
24	Определение уровня АФК и АФА-протеинкиназы в в микроглиальных клетках SIM-A9 при действии γ -квантов, протонов и ТЗЧ.	2018, I	2019, II
25	Определение уровня выхода воспалительных цитокинов в микроглиальных клетках SIM-A9 при действии γ -квантов, протонов и ТЗЧ.	2019, III	2020, IV

26	Введение в эксплуатацию модернизированной установки для высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.	2018, I	2019, I
27	Исследование воздействия ионизирующих излучений разного качества на метаболизм основных возбуждающих (дофамин, гистамин, ацетилхолин, глутамат) и тормозных (ГАМК) нейротрансмиттеров в различных морфологических структурах головного мозга крыс и мышей.	2018, I	2020, IV
28	Исследование уровня тревоги, степени депрессивно-подобного поведения, эмоциональной реактивности, габитуации и обучения, базирующегося на функционировании рабочей и пространственной памяти, у крыс и мышей после воздействия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками.	2018, I	2020, IV
29	Совершенствование флуорометрического метода определения активности каспазы-3 (маркера апоптотической гибели клеток) в тканях различных структур мозга крыс и мышей.	2018, I	2020, IV
30	Исследование связи между изменениями в работе основных нейротрансмиттерных систем и апоптотической гибелью нейронов после облучения.	2018, I	2020, IV
31	Изучение радиационно-индуцированных изменений в функционировании определённых групп рецепторов (опиатных, дофаминовых, ацетилхолиновых, гистаминовых, рецепторов глутамата и ГАМК).	2019, II	2020, IV
32	Математическое моделирование процессов индукции и репарации ключевых типов повреждений ДНК тяжёлыми заряженными частицами	2018, I	2019, IV
33	Математическое моделирование развития радиационно-индуцированного оксидативного стресса в нервных клетках	2018, I	2019, IV
34	Компьютерное моделирование формирования радиационно-индуцированных повреждений в клеточной мембране и цитоскелете	2018, I	2019, IV
35	Компьютерное моделирование формирования радиационно-индуцированных повреждений в мембранных ионных каналах и синаптических контактах	2018, I	2019, IV
36	Моделирование электрической активности нейронов различных типов и морфологии после радиационного поражения	2018, I	2020, IV
37	Моделирование электрической активности нейронных сетей префронтальной коры после радиационного поражения	2019, I	2020, IV
38	Моделирование электрической активности нейронных сетей гиппокампа после радиационного поражения	2019, I	2020, IV
39	Разработка математических моделей для предсказания радиационно-индуцированных нарушений когнитивных функций	2020, I	2020, IV

37	Физическая поддержка проводимых на ускорителях заряженных частиц радиобиологических экспериментов.	2018, I	2020, IV
38	Разработка методов исследования характеристик пучков тяжелых ионов и пучковой дозиметрии.	2018, I	2020, IV
39	Проектирование, тестирование и градуировка приборов ядерной планетологии	2018, I	2020, IV
40	Проектирование новых ядерно-физических установок ОИЯИ в части радиационной безопасности.	2018, I	2020, IV

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

/Красавин Е.А./

/Тимошенко Г.Н./

Смета затрат по проекту «Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц различных энергий»

NN пп	Наименование статей затрат	Полная стоимость (тыс. долл)	1 год	2 год	3 год
	Прямые расходы на Проект				
1.	Материалы	429,9	136,5	142,2	151,2
2.	Оборудование	185,6	58,5	62,3	64,8
3.	Оплата НИР, выполняемых по договорам	-	-	-	-
4.	Командировочные расходы в т.ч.	150	50	50	50
	а) в страны нерублевой зоны				
	б) в города стран рублевой зоны				
	в) по протоколам				
	Итого по прямым расходам	765,5	245	254,5	266

Руководители Проекта

/Красавин Е.А./

/Тимошенко Г.Н./

Директор Лаборатории

/Красавин Е.А./

Ведущий инженер-экономист Лаборатории

/Леснинова И.Ю./