

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института

_____/_____
“ ____ ” _____ 202_ г.

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТКРЫТИЯ ПРОЕКТА
ПО НАПРАВЛЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ПРОБЛЕМНО-ТЕМАТИЧЕСКОМ ПЛАНЕ ОИЯИ**

1. Общие сведения о проекте

1.1. Шифр темы (для продлеваемых проектов) – *шифр темы включает дату открытия, дата окончания не указывается, т. к. она определяется сроками завершения проектов в теме.*

04-9-1077-2009

1.2. Шифр проекта (для продлеваемых проектов и подпроектов)

1.2. Лаборатория

Лаборатория радиационной биологии

1.3. Научное направление

Радиационные исследования в науках о жизни

1.4. Наименование проекта

Молекулярные, генетические и организменные эффекты действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками

1.5. Руководитель(и) проекта

Борейко Алла Владимировна, Лобачевский Павел Николаевич

1.6. Заместитель(и) руководителя проекта (научный руководитель проекта)

2. Научное обоснование и организационная структура

2.1. Аннотация

Целью проекта является исследование закономерностей и механизмов молекулярных, генетических и организменных эффектов действия ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками. Использование в радиобиологических экспериментах ионизирующих излучений широкого диапазона линейных передач энергии позволяет получать уникальную информацию о характере нарушений структуры ДНК клеток при облучении, механизмах формирования генных и структурных мутаций в клетках с различным уровнем организации генома, закономерностях действия корпускулярных излучений на опухолевые образования при лучевой терапии. В рамках Проекта будут решаться фундаментальные и прикладные вопросы современной радиационной биологии: формирование и репарации кластерных повреждений ДНК в нормальных и опухолевых клетках при действии ускоренных

заряженных частиц; исследование радиосенсибилизирующего действия модификатора репарации ДНК (АраЦ) в комбинации с различными молекулярно-биологическими комплексами при облучении опухолевых клеток и тканей; изучение закономерностей индукции генных и структурных мутаций у нормальных и опухолевых клеток при действии заряженных частиц; исследование первичных и отдаленных морфологических и функциональных изменений в центральной нервной системе млекопитающих при действии излучений с различными физическими характеристиками.

2.2. Научное обоснование (цель, актуальность и научная новизна, методы и подходы, методики, ожидаемые результаты, риски)

Введение

Ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками являются эффективным инструментом при решении фундаментальных и прикладных задач современной биологии и медицины. Использование тяжелых заряженных частиц в радиобиологических исследованиях оказалось плодотворным и позволило выявить и изучить особый класс радиационных повреждений ДНК – повреждений кластерного типа, играющих важную роль в формировании различного рода мутаций, инициирующих развитие опухолевых образований. Такие повреждения являются трудно репарируемыми клетками и в значительной мере определяют биологическую эффективность различных видов ионизирующих излучений по критериям их летального действия на нормальные и опухолевые клетки, индукции генных и структурных мутаций, проявлений радиационных эффектов на организменном уровне.

Исследования особенностей биологического действия такого рода излучений представляются крайне важными при решении проблем радиационной медицины. Лучевая терапия с применением пучков ускоренных протонов и ионов углерода является одним из наиболее эффективных путей лечения труднодоступных злокачественных новообразований, в частности, опухолей головного мозга. Изучение различных аспектов действия высокоэнергетических тяжёлых ионов на структуры целостного организма представляется важным и при решении задач космической радиобиологии: обеспечения радиационной безопасности экипажей при реализации полётов в дальний космос.

Наличие широкого спектра источников излучения, в том числе пучков тяжелых ионов различных энергий, на базовых установках ОИЯИ предоставляет уникальную возможность для решения указанных проблем. Планируемые радиобиологические эксперименты на ускорителях института будут нацелены на изучение механизмов действия тяжёлых ионов на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях биологической организации. Особое внимание будет уделено исследованию новых механизмов повышения биологической эффективности лучевой терапии пучками заряженных частиц. Будет продолжен анализ нарушений в центральной нервной системе экспериментальных животных с целью оценки риска радиационного воздействия на организм космонавтов при осуществлении межпланетных полётов.

Научное и методическое обоснование

В отличие от электромагнитных видов ионизирующих излучений, энергия которых равномерно распределяется по объёму ядра облучаемой клетки, при прохождении тяжёлых ионов через вещество энергия распределяется вдоль трека частицы, вызывая сложные кластерные повреждения ДНК. По сравнению с излучениями электромагнитной природы,

заряженные частицы имеют обратное глубинное распределение дозы: минимальная энергия при прохождении частиц через вещество ткани выделяется на начальном участке, и энерговыделение резко возрастает в конце пробега (пик Брэгга).

Среди широкого спектра различных повреждений ДНК при действии ионизирующей радиации наиболее тяжёлыми нарушениями, приводящими к клеточной гибели, являются одновременные нарушения целостности двух нитей ДНК - двунитевые разрывы, которые часто представляют собой повреждения кластерного типа. Двунитевые разрывы образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – прямые ДР (ПДР), вследствие передачи энергии локальному участку ДНК и приводящему к нарушению её целостности, либо формируются из других повреждений как «издержки репарации» в процессе работы репарационных ферментов. Этот тип повреждений относится к разряду энзиматических ДР (ЭДР). При действии излучений с возрастающими величинами ЛПЭ наблюдаются изменения в спектре индуцируемых повреждений ДНК клеток. При низких значениях ЛПЭ с наибольшей частотой формируются повреждения оснований и одностранные разрывы (ОР) ДНК. При облучении тяжёлыми заряженными частицами с высокими значениями ЛПЭ образуются преимущественно двунитевые разрывы, главным образом, типа ПДР, а количество одностранных разрывов снижается. Выход энзиматических двунитевых разрывов ДНК при облучении зависит от многих факторов, как физической, так и биологической природы. Особенности действия заряженных частиц на молекулярно-генетические структуры клеток необходимо учитывать при решении фундаментальных и прикладных проблем современной радиобиологии. Наиболее остро это касается аспектов совершенствования методов лучевой терапии опухолевых образований.

Как известно, *стратегия лучевой терапии* базируется на создании условий, при которых должны быть реализованы следующие основные принципы. *Первый* основывается на создании конформного характера облучения мишени (опухоли) – передачи максимально необходимого количества энергии используемого излучения тканям опухоли с минимальным повреждением прилегающих здоровых тканей. По сравнению с излучениями электромагнитной природы при облучении пучком протонов глубоко залегающих опухолей в пике Брэгга достигается максимальный уровень облучения опухоли при меньшем уровне облучения нормальных, прилегающих к опухоли тканей, а также критических органов. Ещё большие различия в уровне поглощённых доз на разных участках кривой Брэгга присущи ускоренным ионам углерода. *Второй* принцип, связанный с первым, основывается на необходимости максимального повреждения клеток опухолевых тканей при облучении. Это достигается, как указывалось, физическими особенностями передачи энергии заряженных частиц веществу. Резкое возрастание величины ЛПЭ с уменьшением энергии заряженных частиц в области пика Брэгга обуславливает увеличение выхода радиационных повреждений в облучаемых клетках, вызывающих их гибель. Большая биологическая эффективность ускоренных ионов углерода по сравнению с протонами обусловлена высокими значениями ЛПЭ тяжёлых ионов. С учетом этого в ряде стран созданы специализированные центры для углеродной терапии. Однако следует заметить, что стоимость таких ускорителей крайне высока по сравнению с протонными машинами, вследствие чего центры углеродной терапии до последнего времени единичны и стоимость курсов лечения пациентов также исключительно высокая.

Биологическая эффективность пучков частиц определяется факторами различной природы: физическим фактором, связанным с характером энерговыделения в чувствительных

мишенях клеток (ЛПЭ частицы, мощность дозы и т.д.) и биологическим фактором, влияющим на выход повреждений, обуславливающих клеточную гибель (репарационный статус клетки, оксигенация, фаза клеточного цикла, микроокружение опухоли и т.д.). На выход двунитевых разрывов ДНК энзиматической природы при облучении можно влиять путем определенной модификации процессов репарации ДНК. Так в экспериментах *in vitro* было показано, что в условиях влияния ингибиторов синтеза ДНК 1-β-D-арабинозидцитозина (АраЦ) и гидроксимочевины (ГМ) при γ- облучении и действии протонов выход ДР ДНК значительно возрастал в ходе пострadiационной инкубации клеток за счет трансформации не летальных повреждений ДНК в ЭДР. В предварительных исследованиях *in vivo* с облучением протонами привитой мышам опухоли меланомы в присутствии АраЦ было выявлено трехкратное уменьшение скорости роста опухоли в пострadiационный период по сравнению с обычным облучением протонами. Дальнейшее развитие разработанного метода, возможно, позволит значительно сблизить области использования протонных и дорогостоящих углеродных ускорителей для терапевтических целей, а также повысить эффективность терапевтического использования источников фотонного излучения.

Планы освоения дальнего космоса связаны с новыми вызовами для специалистов по космической радиобиологии. Спектр галактических космических лучей (ГКЛ) состоит из высокоэнергетических протонов и ионов с высоким зарядом и энергией. Последние, несмотря на низкие флюенсы, вносят большой вклад в радиационный риск для космонавтов из-за их высокой биологической эффективности. Большая часть знаний о действии ГКЛ основана на наземных экспериментах на ускорителях заряженных частиц. С этой точки зрения, базовые установки ОИЯИ предоставляют широкие возможности для моделирования биологического действия космического излучения. В современной концепции радиационного риска для пилотируемых межпланетных полётов первостепенным признан эргономический риск на протяжении всей миссии, обусловленный нарушением работы центральной нервной системы (ЦНС). Главной задачей здесь является детальное изучение характера и механизмов действия тяжелых заряженных частиц, во-первых, на культуры клеток нервной системы, в особенности на клетки с высокой пролиферативной активностью, а во-вторых, на структуры ЦНС лабораторных животных и их поведение.

С учетом вышеизложенного, решение затрагиваемых фундаментальных и практических проблем настоятельно требует продолжения 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 эффективный метод трёхмерного анализа кластерных двунитевых разрывов ДНК (метод ДНК-фокусов) позволит изучить формирование наиболее тяжёлых повреждений генетического аппарата при действии многозарядных ионов и даст возможность исследовать формирование и репарацию генетических повреждений, как в пролиферирующих тканях, так и в высококодифференцированных элементах нервной системы. Выяснение механизмов ответа на воздействие заряженных частиц различных энергий даст основу понимания тканевых реакций высококодифференцированных клеточных систем – структур различных отделов центральной нервной системы на лучевое воздействие. В свою очередь, эти исследования позволят оценить нарушения интегративной целостности системы – нарушений когнитивных функций, поведенческих реакций. Совершенно очевидна практическая направленность такого рода

комплексных исследований для различных сфер практической деятельности и, прежде всего, решения проблем космической радиобиологии человека.

Особое внимание при выполнении планируемых исследований будет уделено выяснению механизмов, лежащих в основе повышения эффективности биологического действия протонных и фотонных пучков на радиорезистентные опухолевые клетки, моделированию радиационного воздействия на опухолевые образования, привитые экспериментальным животным. Принимая во внимание ранее полученные результаты о модифицирующем влиянии агентов типа арабинозидцитозина в комбинации с другими препаратами на выход двунитевых разрывов ДНК при действии ионизирующих излучений разного качества, а также возможные перспективы практического применения ингибиторов синтеза ДНК данного типа и ионизирующих излучений в клинике, необходимы дальнейшие исследования в рамках предложенной темы.

Направления планируемых исследований

Молекулярная радиобиология

В ЛРБ ОИЯИ в течение ряда лет с использованием различных молекулярно-биологических методов проводятся исследования нарушений в генетических структурах нормальных и опухолевых клеток при действии ионизирующих излучений широкого спектра ЛПЭ. В последние годы для этих целей активно используются иммуноцитохимический и иммуногистохимический методы исследования. Применение таких методов позволяет не только количественно оценивать формирование молекулярных нарушений, но и учитывать их пространственное распределение в генетических структурах. Наиболее тяжелыми повреждениями являются двунитевые разрывы ДНК. Индукция двунитевых разрывов ДНК в определенных участках генома приводит к специфическому фосфорилированию гистона H2AX в окружающем повреждение хроматине, что проявляется в образовании так называемых γ H2AX - фокусов. Внутренняя структура этих радиационно-индуцированных фокусов (РИФ) является отражением взаимосвязи биохимических процессов, запускаемых в ответ на возникновение повреждения и направленных на восстановление целостности ДНК. Особый интерес представляет сравнительный анализ закономерностей и механизмов индукции и репарации повреждений молекулы ДНК в нормальных и радиорезистентных опухолевых клетках, облученных γ -квантами, протонами различных энергий и тяжелыми ускоренными ионами.

Ранее нами изучены дозовые зависимости частоты образования ДНК-фокусов в клетках человека при действии излучений с разной величиной ЛПЭ. Выявлена большая эффективность их формирования при действии ускоренных тяжёлых ионов по сравнению с γ -облучением. Обнаружено, что при действии на клетки тяжёлых ионов по сравнению с γ -квантами наблюдается более высокая скорость достижения максимального количества ДНК-фокусов и замедленная кинетика их элиминации. На основе дифференцированного анализа отдельных ДНК-фокусов в трехмерных изображениях, реконструирующих весь объем клеточного ядра, проведен детальный анализ структуры сложно организованных кластеров повреждений в треках ускоренных ионов. Установлено, что при действии ускоренных тяжёлых ионов низких и промежуточных энергий, в отличие от γ -облучения, формируются сложноорганизованные кластеры, включающие до шести и более индивидуальных фокусов. Выявлено изменение структуры, размера и формы кластерных повреждений, зависимое от величины ЛПЭ частиц. Показано замедление кинетики элиминации радиационно-индуцированных фокусов в клетках

при действии тяжёлых ионов по сравнению с γ -облучением. С учетом возможностей дифференцированного анализа отдельных ДНК-фокусов в трехмерных изображениях в планируемых исследованиях предполагается изучить характер однонитевых повреждений кластерного типа в ДНК клеток при действии протонов в диапазоне энергий, используемых для терапевтических целей.

С учетом ранее полученных результатов по модифицирующему влиянию арабинозидцитозина на формирование двунитевых разрывов ДНК в нормальных и опухолевых клетках предполагается дальнейшее исследование влияния АраЦ на радиочувствительность клеток в комбинации с другими молекулярно-биологическими комплексами. С использованием иммуноцитохимического метода анализа формирования ДР ДНК и метода количественного определения клеточной выживаемости планируется разработка подходов к повышению радиочувствительности различных клеточных линий к действию излучений, различающихся по ЛПЭ. Предполагается исследовать закономерности нарушения молекулярно-биохимических механизмов в условиях влияния модификаторов при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ в нормальных и радиорезистентных клетках злокачественных опухолей. В качестве объектов исследования будут использованы культуры фибробластов и клетки глиобластомы человека (U87), а также клетки меланомы мышей (B16).

В исследованиях будут использованы не только клеточные культуры нормальных и опухолевых клеток, но и культуры нейрональных клеток, а также гистологические срезы тканей различных отделов центральной нервной системы облученных животных.

Ожидаемые результаты:

- Изучить закономерности формирования кластерных ДР ДНК при действии ускоренных заряженных частиц различных энергий в ядрах фибробластов кожи человека, опухолевых клетках (U87, B16) и нейронах различных отделов центральной нервной системы облученных животных;
- Исследовать кинетику репарации кластерных ДР ДНК в пострadiационный период в ядрах фибробластов кожи человека и радиорезистентных опухолевых клетках;
- Исследовать закономерности и механизмы радиосенсибилизирующего действия арабинозидцитозина в комбинации с различными молекулярно-биологическими комплексами на нормальные и опухолевые клетки при действии излучений с различной ЛПЭ;
- Исследовать количественные закономерности выживаемости нормальных и опухолевых клеток при облучении в условиях комбинации модификаторов репарации ДНК.

Радиационная генетика

Вопросы мутагенного действия ионизирующих излучений разного качества, в особенности ускоренных тяжелых ионов, на клетки млекопитающих и человека до настоящего времени изучены недостаточно. Планируется продолжить начатые ранее в ЛРБ ОИЯИ исследования закономерностей и механизмов индукции различных типов генных и структурных мутаций в зависимости от дозы и величины ЛПЭ излучения, репарационного статуса, а также механизмов генетической стабильности.

Очевидно, что исследование закономерностей и механизмов индукции мутаций в клетках человека при действии различных типов ионизирующих излучений является крайне

сложной задачей. Удобными модельными объектами для этих целей служат клеточные культуры млекопитающих и низших эукариот. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – одноклеточный эукариотический организм, у которого наиболее полно изучены генетический контроль и молекулярные механизмы таких фундаментальных клеточных процессов как репликация, репарация, транскрипция. В работе используются гаплоидные тестерные штаммы для детекции различных молекулярных событий (замены пар оснований, выпадения одного нуклеотида, делеции, рекомбинационные перестройки). Система тестирования прямых генных мутаций, применяемая в лаборатории, позволяет детектировать любые генные мутации на протяженном участке, а именно возникающие в пределах гена аргинин пермиазы размером 1.8 тпн. Помимо ядерной ДНК в клетках имеется митохондриальная ДНК (мтДНК), мутагенез и функциональная значимость которой на настоящий момент изучены недостаточно. Легкость манипулирования мтДНК у дрожжей делает их идеальным объектом для изучения роли митохондрий и мтДНК в мутагенном эффекте радиации, в частности обусловленном дыханием и метаболизмом железа.

Планируется продолжить изучение закономерностей индукции ядерных и митохондриальных мутаций под действием редко- и плотноионизирующих излучений с помощью вышеупомянутых тестерных систем. Главное внимание в этих исследованиях будет уделено сравнению вклада точечных и структурных мутаций, индуцированных излучениями с разной ЛПЭ, с целью выявления типа молекулярных повреждений ДНК, приводящих к этим мутациям, и механизмов их образования, отражающих взаимосвязь между характером энергопоглощения в треке заряженной частицы и спектром индуцированных мутаций. Для уточнения молекулярной природы мутаций, будет использовано секвенирование индуцированных точечных мутаций и электрофоретический и рестрикционный анализ делеционных мутантов. Опираясь на полученные ранее результаты, планируется исследовать также эффект ряда факторов, способных как влиять на радиационно-индуцированный мутагенез, так и на методические аспекты регистрации мутаций. Одним из таких факторов является присущая гаплоидным дрожжевым клеткам гетерогенности клеточной популяции, поэтому планируется оценить мутагенез у делящихся (G1, S, G2), покоящихся (G0, quiescent) и старых (senescent) клеток.

Для более глубокого понимания механизмов возникновения спонтанных и индуцированных мутаций и перестроек планируется изучить модифицирующие эффекты дефектов в генах ошибочной пост-репликативной репарации и в генах, осуществляющих эпигенетические модификации гистонов, генетический контроль точности и копийности митохондриального генома, контроль апоптоза и старения клеток.

Несомненный интерес представляют механизмы, повышающие радиорезистентность и снижающие мутагенез. Ранее нами была получена и генетически охарактеризована ядерная мутация, имеющая широкий спектр действия, в том числе повышающая радиорезистентность клеток и влияющая на генетическую стабильность. Планируется исследовать механизм радиорезистентности, картировать эту мутацию и провести анализ влияния мутации на экспрессию генома. Предварительные данные белкового электрофореза показали, что мутация локализована в регуляторном гене.

Предполагается продолжить исследования мутагенного действия редко и плотноионизирующих излучений на клетки млекопитающих и оценить мутагенное действие излучений разного качества. Ранее было показано, что при увеличении периода экспрессии наблюдается

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». 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. Наблюдаемая вариабельность цитогенетических показателей, по-видимому, определяется типом возникающих мутаций при действии излучений с разной ЛПЭ. Возможно, это связано не только с точечными мутациями, но и со структурными изменениями гена. Последствия этого воздействия могут проявляться в ряду клеточных поколений.

Ожидаемые результаты:

- Изучить закономерности индукции точечных и структурных мутаций у клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* излучениями с разной ЛПЭ;
- Изучить влияние гетерогенности клеточной популяции у гаплоидных дрожжей на радиационно-индуцированный мутагенез; оценить мутагенез в различных фазах клеточного цикла;
- Изучить влияние нарушения дыхания в результате повреждения митохондриальной ДНК на чувствительность к мутагенному действию излучения;
- Исследовать механизм радиорезистентности и его влияние на радиационно-индуцированный мутагенез у дрожжевого мутанта;
- Выполнить исследование радиационно-индуцированного мутагенеза и сопоставить выход хромосомных aberrаций в клетках китайского хомячка (линия V-79) при максимальном и минимальном уровне мутагенеза в зависимости от времени экспрессии и ЛПЭ ускоренных ионов;
- Провести анализ структурных нарушений в *hprt*-гене и их проекции на нарушения хромосомного аппарата клеток.

Радиационная цитогенетика

Изучение индукции хромосомные aberrации под действием ионизирующего излучения и других цитотоксических агентов имеет долгую историю. Классический метафазный метод анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови более полувека остается практически единственным методом биодозиметрии человека, позволяющим оценить дозу радиации, полученную индивидом при радиационных инцидентах, медицинской диагностике, радиотерапии рака. Сочетание метафазного метода и более информативного современного метода 24-цветной окраски хромосом mFISH (multicolor Fluorescence in situ Hybridization) дает неоценимое преимущество при изучении цитогенетического действия заряженных частиц. Этот метод, используемый в ЛРБ в настоящее время, позволяет идентифицировать каждую пару хромосом человека и животных путем гибридизации ДНК хромосом с пробами, мечеными уникальными сочетаниями 5 флуорохромов, и анализировать все виды структурных перестроек между ними.

Основным преимуществом метода mFISH является возможность исследовать комплексные aberrации хромосом, в которые вовлечены 3 и более разрывов в двух и более хромосомах с идентификацией каждой вовлеченной хромосомы. Применение метода mFISH показало, что большое число aberrаций, которые раньше считали простыми, являются частью комплекса,

включающего разрывы в нескольких хромосомах и взаимодействие их между собой. Таким образом, внедрение mFISH приводит к необходимости переоценки всех постулатов классической цитогенетики, меняет представления о хромосомных aberrациях, их спектре и распределении по клеткам. Комплексные aberrации хромосом характерны для плотно-ионизирующих излучений и отражают кластерный характер формирования ДР ДНК вдоль трека частицы. Таким образом, использование метода mFISH позволяет получить новые представления о механизмах образования радиационно-индуцированных aberrаций, отражающих взаимосвязь между характером энергопоглощения в треке заряженной частицы, уровнем сложности кластерных повреждений ДНК и образованием комплексных aberrаций хромосом. Исходя из этого, предполагается использование mFISH в первую очередь для оценки комплексных хромосомных aberrаций, индуцированных излучениями разного качества.

Несмотря на неослабевающий интерес к протонной радиотерапии рака и огромное количество работ, включая цитогенетические исследования действия протонов, работ с использованием метода mFISH до сих пор нет. Поэтому детальный анализ спектра хромосомных aberrаций, индуцированных пучками протонов, весьма актуален.

Наряду с проведением экспериментов на ускорителях ОИЯИ, планируется проведение экспериментов на новых базовых установках ЛРБ: рентгеновских аппаратах SARRP (XStrahl, USA) 220кВ и CellRad (Precision, USA) 130 кВ. Последняя имеет также режим работы 30 кВ. Низкоэнергетическое рентгеновское излучение широко используется в медицинской диагностике, хотя его биологическая эффективность недостаточно изучена и последние 20 лет является предметом постоянных дискуссий. Известно небольшое количество работ по цитогенетическим эффектам этого излучения, но данные, полученные методом mFISH, которые могут дать полное представление о количестве и спектре хромосомных aberrаций, отсутствуют.

Исследования с использованием mFISH опубликованы для высокоэнергетических тяжелых ионов с энергиями до 1 ГэВ/н, таких как ионы железа, углерода и т.д.; для α -частиц и низкоэнергетических ионов с энергиями до 10 МэВ/н, но для ионов промежуточных энергий (20-60 МэВ/н) данные отсутствуют. Такие пучки имеются на базовых установках ОИЯИ. Изучается действие таких ускоренных ионов на нормальные и опухолевые клетки человека и млекопитающих.

В комплексе с метафазным и mFISH методом для сравнительной оценки индукции и репарации разрывов хроматина в нормальных и опухолевых клетках предполагается использовать метод химически индуцированной преждевременной конденсации хроматина, позволяющий измерять изначальный уровень разрывов ДНК, индуцированных облучением, а также кинетику их репарации.

Ожидаемые результаты:

- Выполнить исследование биологической эффективности протонных пучков методом mFISH;
- Методом mFISH изучить биологическую эффективность низкоэнергетического рентгеновского излучения при облучении *in vitro* лимфоцитов крови человека;
- Оценить вклад комплексных хромосомных aberrаций в биологическую эффективность плотноионизирующих излучений при облучении нормальных и опухолевых клеток человека *in vitro*;
- Изучить индукцию и кинетику репарации разрывов хроматина методом преждевременной конденсации хроматина в нормальных и опухолевых клетках человека при действии редко- и плотноионизирующих излучений.

Радиационная физиология

Радиационно-физиологические исследования в предстоящий период будут нацелены, главным образом, на изучение нарушений поведенческих реакций облученных животных и патоморфологических изменений в различных критических органах и системах грызунов. Для решения этой задачи будет проведена оценка поведенческих реакций с использованием полного набора средств и методов современной зоопсихологии, включающих тест-системы для оценки долговременной и кратковременной памяти, обучаемости, эмоциональной реактивности, уровня тревоги и моторных рефлексов, социального поведения. Анализ параметров поведения будет проводиться с применением современных программно-информационных систем видеотрекинга. Исследование патоморфологических изменений в тканях будет проводиться с использованием современных гистологических и иммуногистохимических методов на световом и флуоресцентном микроскопическом оборудовании, с последующим анализом с применением специализированного программного обеспечения. Исследование биоэлектрической активности головного мозга будет проведено с использованием современных инвазивных методов электрофизиологии.

Нормальную жизнедеятельность нейронов в ЦНС обеспечивают глиальные клетки. Этот тип клеток включает астроциты, микроглиальные и эпендимальные клетки, олигодендроциты и их предшественники. Они осуществляют динамический мониторинг состояния нервной системы, контролируют и поддерживают интегративную деятельность головного мозга. Ряд исследований позволил установить, что причиной радиационно-индуцированных нейродегенеративных изменений в ЦНС является хронический нейровоспалительный процесс, связанный с активацией микроглии. Этот процесс приводит к разрушению миелиновой оболочки аксонов, нарушению нейронной архитектуры, потере дендритов, проницаемости гематоэнцефалического барьера, нарушению нейрогенеза и других жизненно важных процессов в ЦНС. Ключевым компонентом этого ответа является микроглия, резидентные иммунные клетки ЦНС. В настоящее время микроглия рассматривается в качестве терапевтической мишени для предотвращения радиационно-индуцированных патологических изменений в мозге, ведущих к когнитивным расстройствам. Поэтому планируется продолжить исследование воспалительных процессов и роли микроглиальных клеток при действии ионизирующих излучений, а также возможности модуляции этих процессов с использованием ингибиторов к рецепторам сигнальных каскадов, вовлеченных в реакцию микроглии на радиационное воздействие.

Ожидаемые результаты:

- Выполнить исследование первичных и отдаленных морфологических и функциональных изменений в центральной нервной системе крыс при с различными физическими характеристиками;
- Провести исследования средств фармакологической защиты при воздействии ионизирующих излучений;
- Провести исследование влияния излучений с различной ЛПЭ на патогенез в органах и тканях организма мелких лабораторных животных;
- Исследовать активацию микроглиальных клеток в культуре клеток и маркеров воспаления в мозге мышей при действии ионизирующих излучений разного качества;

- Исследовать возможность модуляции активации микроглиальных клеток в облученной культуре и нейровоспаления в мозге облученных мышей с использованием ингибиторов к рецепторам сигнальных путей, вовлеченных в эти процессы.

Молекулярно-радиобиологические аспекты лучевой терапии

Лучевая гибель клеток, как известно, преимущественно обусловлена формированием в их ДНК двунитевых разрывов (ДР). Среди широкого спектра различных лучевых повреждений ДНК такие молекулярные нарушения являются наиболее тяжёлыми. Как уже указывалось выше, они образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – прямые ДР (ПДР), вследствие передачи энергии локальному участку ДНК и приводящему к нарушению её целостности, либо формируются из других повреждений как «издержки репарации» в процессе работы репарационных ферментов. Этот тип повреждений относится к разряду энзиматических ДР (ЭДР). При действии излучений с возрастающими величинами ЛПЭ наблюдаются изменения в спектре индуцируемых повреждений ДНК клеток. При низких значениях ЛПЭ с наибольшей частотой формируются повреждения оснований и одностранные разрывы (ОР) ДНК. При облучении тяжёлыми заряженными частицами с высокими значениями ЛПЭ образуются преимущественно ПДР ДНК, а количество одностранных разрывов снижается.

Выход двунитевых разрывов ДНК энзиматической природы при облучении зависит от многих факторов биологической природы и на частоту их формирования можно влиять, используя определённые подходы, основанные на модификации процессов репарации ДНК. С учетом этих обстоятельств можно сделать вывод о том, что биологическая эффективность излучений будет определяться факторами различной природы: физическим фактором, связанным с характером энерговыделения в чувствительных мишенях клеток и биологическим фактором, влияющим на выход повреждений, обуславливающих клеточную гибель. Последнее делает возможным повышение эффективности пучков протонов при терапевтическом использовании.

С учетом важной роли энзиматических ДР в радиочувствительности клеток ранее нами было исследовано модифицирующее влияние 1-β-D-арабинозидцитозина (АраЦ) на чувствительность нормальных клеток к действию излучений, различающихся по величине ЛПЭ в широком диапазоне. Было установлено, что при γ-облучении и действии протонов в условиях влияния этого агента радиочувствительность клеток животных и человека в культуре двукратно увеличивается, а выход ДР ДНК значительно возрастает в ходе пострadiационной инкубации. В основе механизма усиливающего влияния этого агента на радиочувствительность клеток лежит блокирование ДНК-полимераз, ведущих репаративный синтез ДНК в процессе репарации. В результате этого происходит длительная фиксация возникающих прямых одностранных разрывов ДНК, либо ОР, формирующихся в ходе эксцизионной репарации. Такие повреждения могут являться сайтами формирования ЭДР ДНК в результате атаки нити, оппозитной поврежденному участку, эндонуклеазами типа S.

Учитывая полученные данные о способности АраЦ существенно повышать количество двунитевых повреждений ДНК при действии ионизирующих излучений на клеточные культуры *in vitro*, нами было изучено влияние этого агента на рост меланомы линии В16 и ряд процессов, связанных с радиационным ответом опухоли при комбинированном действии этого соединения и протонного излучения в очаговой дозе 10 Гр, в сравнении с таковыми после одиночного

облучения пучком протонов *in vivo*. Установлено значительное торможение роста опухоли в обеих группах облученных животных по сравнению с контролем, при этом наиболее выраженный эффект отмечался при комбинированном воздействии. Молекулярные показатели клеточной гибели и пролиферативной активности изменялись примерно в одинаковой степени после изучаемых воздействий по сравнению с контролем. Однако доля опухолевых стволовых клеток (ОСК) была снижена в 3,1 раза после комбинированного воздействия по сравнению с одиночным облучением, что, по крайней мере частично, объясняет эффект наибольшего торможения опухолевого роста при облучении на фоне АраЦ. С учетом важности полученных результатов по модификации ингибитором АраЦ торможения роста опухоли у облученных животных предполагается проведение дальнейших исследований влияния АраЦ на опухолевый рост в комбинации с другими молекулярно-биологическими комплексами. Для решения этой задачи будут проведены эксперименты на животных с привитыми опухолями с оценкой регресса очага болезни с использованием методов компьютерной томографии на установке SARRP с последующим гистологическим исследованием.

Ожидаемые результаты:

- Исследовать *in vivo* закономерности радиосенсибилизирующего влияния арабинозид-цитозина в комбинации с другими молекулярно-биологическими комплексами на рост опухоли меланомы у мышей при комбинированном действии этих соединений и протонного излучения.
- Изучить влияние комбинированного действия АраЦ и других молекулярно-биологических комплексов на выживаемость различных линий нормальных и опухолевых клеток по критерию клонообразования при облучении рентгеновскими лучами и протонами;
- Исследовать кинетику формирования и элиминации повреждений ДНК в культуре клеток глиобластомы U87 и других радиорезистентных линий при облучении протонами и рентгеновскими лучами в присутствии АраЦ и других молекулярно-биологических комплексов;
- Изучить закономерности формирования двунитевых разрывов ДНК в различных отделах центральной нервной системы при облучении *in vivo* протонами и рентгеновскими лучами в условиях влияния комбинации радиомодификаторов.

Развитие исследовательской инфраструктуры

По мере выполнения международной программы радиобиологических исследований по проекту необходимо поэтапное обновление оборудования и создание новых установок. Развитие исследовательской инфраструктуры предусматривает следующие составляющие:

- 1) ввод в эксплуатацию оборудования для молекулярных и клеточных омикс-исследований (масс-спектрометры, высокопроизводительный секвенатор, проточный цитофлуориметр-сортировщик, лазерный конфокальный сканирующий микроскоп и др);
- 2) модернизация вивария и ввод в эксплуатацию оборудования для мультимодальной томографии животных.

Оценка рисков

Важнейшую роль в обеспечении проекта играет предоставление необходимого времени работы на ускорителях ОИЯИ, а также ресурсов МИВК. Возможные сложности технического и

организационного характера могут быть решены путем взаимодействия с координаторами от сотрудничающих Лабораторий ОИЯИ.

Финансовые риски могут быть обусловлены сложностями в поставках уникального высокотехнологичного оборудования, материалов и реагентов. В этом случае возможно временное использование оборудования организаций-участников проекта.

Риски кадрового дефицита не предвидятся. В состав участников входят как известные ученые с мировым именем, так и большое число молодых специалистов.

2.3. Предполагаемый срок выполнения

2024-2028

2.4. Участвующие лаборатории ОИЯИ

2.4.1. Потребности в ресурсах МИВК

Вычислительные ресурсы	Распределение по годам				
	1 год	2 год	3 год	4 год	5 год
Хранение данных (ТБ) - EOS - Ленты	-	-	-	-	-
Tier 1 (ядро-час)	-	-	-	-	-
Tier 2 (ядро-час)	-	-	-	-	-
СК «Говорун» (ядро-час) - CPU - GPU	-	-	-	-	-
Облака (CPU ядер)	-	-	-	-	-

2.5. Участвующие страны, научные и научно-образовательные организации

Организация	Страна	Город	Участники	Тип соглашения
ЕрГУ	Армения	Ереван	Арутюнян Р.М.	
НИИЯП БГУ	Беларусь	Минск	Кулагова Т.А.	программа сотр.
Институт физиологии НАНБ	Беларусь	Минск	Кульчицкий В.А.	
ИБКИ НАНБ	Беларусь	Минск	Антоневич Н.Г.	
ИЭ БАН	Болгария	София	Аврамов Л.А.	
НЦРРЗ	Болгария	София	Христова Р.	протокол
Институт микробиологии БАН	Болгария	София	Данова С.	протокол
INPC VAST	Вьетнам	Ханой	Wu Thi Ha, Trinh Thi Thu Huong	
CENTIS	Куба	Гавана	Гонзалез И.	

ТИБОХ ДВО РАН	Россия	Владивосток	Кусайкин М.И., Ермакова С.П.	соглашение
ФИЦ КазНЦ РАН	Россия	Казань	Самигуллин Д.В.	
ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА	Россия	Москва	Осипов А.Н., Рождественский Л.М.	
ФЦМН ФМБА	Россия	Москва	Белоусов В.В.	
ИБМХ	Россия	Москва	Лисица А.В., Трифонов О.П.	протокол
ИВНДиНФ РАН	Россия	Москва	Павлова Г.В.	
МГУ	Россия	Москва	Латанов А.В.	
НИЦ «Курчатовский институт»	Россия	Москва	Москалева Е.Ю.	
ИХБФМ СО РАН	Россия	Новосибирск	Дымова М.А., Сильников В.Н.	
МРНЦ им. А.Ф. Цыба	Россия	Обнинск	Селиванова Е.И., Якимова А.О., Мосина В.А., Корякин С.Н., Хвостунов И.К.	
Институт физиологии РАН	Россия	С.-Петербург	Филаретова Л.П.	
НИИ медицинской приматологии	Россия	Сочи	Клоц И.Н.	
UMF	Румыния	Бухарест	Верга Н.	
Институт ядерных наук «Винча»	Сербия	Белград	Степич М., Аджич М., Вранез С.	программа сотр.
Институт биологических исследований «Синиша Станкович»	Сербия	Белград	Попов А.	программа сотр.
Университет Крагуевац	Сербия	Крагуевац	Маркович З.	программа сотр.
JFMED CU	Словакия	Братислава	Balentova S.	протокол
iThemba LABS	ЮАР	Фаур	Vandervoorde Ch.	программа сотр.
University of the Western Cape	ЮАР	Белвилл	Rahiman F.	программа сотр.

2.6. Организации-соисполнители (те сотрудничающие организации/партнеры без финансового, инфраструктурного участия которых выполнение программы исследований невозможно. Пример — участие ОИЯИ в экспериментах LHC в CERN)

3. Кадровое обеспечение

3.1. Кадровые потребности в течение первого года реализации

№№ п/п	Категория работника	Основной персонал, сумма FTE	Ассоциированный персонал, сумма FTE
1.	научные работники	37	-
2.	инженеры	10	-
3.	специалисты	-	-
4.	рабочие	-	-
	Итого:	47	-

3.2. Доступные кадровые ресурсы

3.2.1. Основной персонал ОИЯИ

№№ п/п	Категория работников	ФИО	Подразделение	Должность	Сумма FTE
1.	научные работники	Бугай А.Н. Красавин Е.А. Борейко А.В. Лобачевский П.Н. Кошлань И.В. Колтовая Н.А. Замулаева И.А. Заднепрянец М.Г. Кошлань Н.А. Насонова Е.А. Чаусов В.Н. Комова О.В. Корогодина В.Л. Матчук О.Н. Виноградова О.О. Виноградова Ю.В. Куцало П.В. Северюхин Ю.С. Храмко Т.С. Шванева Н.В. Буденная Н.Н. Виноградова В.С.	ЛРБ	директор лаб. науч. рук. лаб. зам. дир. по науч. раб. нач. отдела уч. секретарь вед. науч. сотр. вед. науч. сотр. нач. группы нач. группы нач. группы ст. науч. сотр. ст. науч. сотр. ст. науч. сотр. науч. сотр. науч. сотр. науч. сотр. науч. сотр. науч. сотр. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр.	37

		Голикова К.Н. Жучкина Н.И. Ильина Е.В. Коваленко М.А. Кожина Р.А. Кокорева А.Н. Колесникова И.А. Крупнова М.Е. Кузьмина Е.А. Куликова Е.А. Мельникова Ю.В. Нуркасова А. Петрова Д.В. Пронских Е.В. Тиунчик С.И. Утина Д.М. Шамина Д.В. Шипилова Е.А.		мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр. мл. науч. сотр.	
2.	инженеры	Тюпикова Т.В. Мельникова Л.А. Исакова М.Д. Смирнова И.В. Пахомова Н.В. Нгуен Бао Нгок Базлова Т.Н. Ержан К. Лхасурэн П.О. Голубева Е.В. Тилавова Г.Т.	ЛРБ	вед. инженер ст. инженер инженер инженер инженер инженер ст. техник ст. лаборант ст. лаборант лаборант лаборант	10
3.	специалисты	-	-	-	-
4.	рабочие	-	-	-	-
	Итого:	51			47

3.2.2. Ассоциированный персонал ОИЯИ

№№ п/п	Категория работников	Организация-партнер	Сумма FTE
1.	научные работники	-	-
2.	инженеры	-	-
3.	специалисты	-	-
4.	рабочие	-	-
	Итого:	-	-

4. Финансовое обеспечение

4.1. Полная сметная стоимость проекта

Прогноз полной сметной стоимости (указать суммарно за весь срок, за исключением ФЗП).

Детализация приводится в отдельной форме.

5 090 000 \$

4.2. Внебюджетные источники финансирования

Предполагаемое финансирование со стороны соисполнителей/заказчиков — общий объем.

—

Руководители проекта

_____/_____/_____
_____/_____/_____

Дата представления проекта в ДНОД _____

Дата решения НТС Лаборатории _____, номер документа _____

Год начала проекта _____

(для продлеваемых проектов) — год начала работ по проекту _____

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
Проекта**

Наименования затрат, ресурсов, источников финансирования		Стоимость (тыс. долл.) потребности в ресурсах	Стоимость, распределение по годам					
			1 год	2 год	3 год	4 год	5 год	
	Международное сотрудничество (МНТС)	590 k\$	100	100	130	130	130	
	Материалы	500 k\$	100	100	100	100	100	
	Оборудование и услуги сторонних организаций (пуско-наладочные работы)	3500 k\$	700	700	700	700	700	
	Пуско-наладочные работы	-	-	-	-	-	-	
	Услуги научно- исследовательских организаций	500 k\$	100	100	100	100	100	
	Приобретение программного обеспечения	-	-	-	-	-	-	
	Проектирование/строительство	-	-	-	-	-	-	
	Сервисные расходы (планируются в случае прямой принадлежности к проекту)	-	-	-	-	-	-	
Необходимые ресурсы	Нормо-час	Ресурсы						
		- сумма FTE	235	47	47	47	47	
		- ускорителя/установки:						
		SARRP (ЛРБ)	960	192	192	192	192	
		У400М (ЛЯР)	1000	200	200	200	200	
		Нуклотрон (станция SIMBO) (ЛФВЭ)	1000	200	200	200	200	
		Линак-200 (ЛЯП)	150	30	30	30	30	
		ИРЕН (ЛНФ)	150	30	30	30	30	
- реактора								
Источники финансирования	Бюджетные средства	Бюджет ОИЯИ (статьи бюджета) ст. 5, 6, 10 ст.4	4500 k\$ 590 k\$	900 100	900 100	900 130	900 130	900 130

	Внебюджет (доп. смета)	Вклады соисполнителей	-	-	-	-	-	-
		Средства по договорам с заказчиками	-	-	-	-	-	-
		Другие источники финансирования	-	-	-	-	-	-

Руководители проекта _____ / _____ /

_____ / _____ /

Экономист Лаборатории _____ / _____ /

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

НАИМЕНОВАНИЕ ПРОЕКТА

Молекулярные, генетические и организменные эффекты действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками

УСЛОВНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ПРОЕКТА

ШИФР ПРОЕКТА

ШИФР ТЕМЫ

04-9-1077-2009

ФИО РУКОВОДИТЕЛЕЙ ПРОЕКТА

Борейко Алла Владимировна, Лобачевский Павел Николаевич

СОГЛАСОВАНО

ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ИНСТИТУТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИНСТИТУТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛИ ТЕМЫ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ОДОБРЕН ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА